



Universidad Autónoma de Madrid



**Universidad Autónoma de Madrid**  
**Departamento de Biología Molecular**  
**Facultad de Ciencias**

**Cambios estructurales implicados  
en la maduración de la cápsida del  
bacteriófago T7**

**- TESIS DOCTORAL -**

**Alina Elena Ionel**  
**Madrid, 2013**





Universidad Autónoma de Madrid



# **Universidad Autónoma de Madrid**

## **Departamento de Biología Molecular**

### **Facultad de Ciencias**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Biológicas por

**Alina Elena Ionel**

Universidad Autónoma de Madrid  
Enero de 2013

#### **DIRECTORES DE TESIS:**

**Dr. José López Carrascosa**  
C.N.B.-C.S.I.C.

**Dr. Jaime Martín-Benito**  
C.N.B.-C.S.I.C.



CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA







El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (C.N.B.-C.S.I.C.) bajo la dirección conjunta de los Drs. José López Carrascosa y Jaime Martín-Benito.



# Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	ii
<b>Summary</b> .....	iv
<b>1 Introducción</b> .....	5
<b>1.1</b> Características generales de los virus .....	3
<b>1.2</b> Linajes virales: diversidad y conservación .....	4
<b>1.2.1</b> Linaje tipo HK97.....	5
<b>1.3</b> Bacteriófagos con cola. Características generales .....	6
<b>1.4</b> Cápsidas icosaedricas. Ensamblaje y maduración.....	9
<b>1.4.1</b> Principios geométricos de la simetría icosaedrica. ....	10
<b>1.4.2</b> El ensamblaje y la estructura de las precabezas .....	13
<b>1.4.3</b> La transición precabeza-cabeza madura.....	14
<b>1.5</b> El bacteriófago T7 .....	16
<b>1.5.1</b> Morfogénesis y ensamblaje.....	16
<b>1.5.2</b> Estructura y detalles moleculares de la precabeza de T7 .....	18
<b>1.5.3</b> La maduración de la cápsida de T7 a media resolución.....	20
<b>2 Objetivos</b> .....	23
<b>3 Materiales y Métodos</b> .....	27
<b>3.1</b> Material Biológico.....	29
<b>3.1.1</b> Virus.....	29
<b>3.1.2</b> Cepas bacterianas.....	29
<b>3.2</b> Amplificación y purificación del bacteriófago T7 .....	29
<b>3.3</b> Amplificación del fago mutante T7 5-am .....	29
<b>3.4</b> Titulación de los stocks de fagos .....	30
<b>3.5</b> Producción y purificación de precabezas de T7 .....	30
<b>3.6</b> Obtención del bacteriófago T7 vacío de ADN.....	31

<b>3.7</b>	<b>Gel de agarosa en condiciones nativas .....</b>	<b>31</b>
<b>3.8</b>	<b>Preparación de las muestras para microscopía electrónica.....</b>	<b>31</b>
<b>3.8.1</b>	<b>Tinción negativa.....</b>	<b>31</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Criomicroscopía electrónica.....</b>	<b>32</b>
<b>3.9</b>	<b>Procesamiento digital de imágenes y reconstrucción tridimensional de partículas individuales .....</b>	<b>32</b>
<b>3.10</b>	<b>Segmentación de mapas tridimensionales .....</b>	<b>35</b>
<b>3.11</b>	<b>Detección de elementos de estructura secundaria.....</b>	<b>36</b>
<b>3.12</b>	<b>Generación del modelo atómico de gp10 para la cabeza y precabeza.....</b>	<b>37</b>
<b>3.13</b>	<b>Análisis estructural.....</b>	<b>38</b>
<b>3.14</b>	<b>Números de acceso de los modelos atómicos y de la estructura de criomicroscopía electrónica.....</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Producción y purificación del bacteriófago T7 maduro.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Obtención y análisis de partículas maduras vacías de ADN mediante tratamiento químico .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Ensayos para liberar el ADN del virus .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Análisis de las partículas tratadas con 2M urea y 0,1M EDTA.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Análisis de las partículas tratadas con 1M NaClO<sub>4</sub>.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3</b>	<b>Análisis estructural del virus maduro sin ADN .....</b>	<b>50</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Características generales.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Segmentación de la unidad asimétrica.....</b>	<b>51</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Predicción de elementos de estructura secundaria.....</b>	<b>52</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Generación del modelo atómico de la proteína gp10A y su correspondiente ajuste en el volumen promedio del hexón .....</b>	<b>53</b>
<b>4.4</b>	<b>Cambios estructurales durante la maduración del bacteriófago T7.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Cambios globales de la cápsida.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Cambios en la proteína de la cápsida gp10A.....</b>	<b>60</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Cambios del potencial electrostático superficial. ....</b>	<b>62</b>

<b>4.4.4</b> Cambios en las interacciones entre monómeros.....	63
<b>4.5</b> Análisis de la estabilidad global de la cápsida de T7 .....	65
<b>5</b> <b>Discusión</b> .....	69
<b>5.1</b> Reorganización de los dominios que forman la proteína de la cápsida .....	72
<b>5.2</b> Mecanismo de estabilización de la cápsida en el proceso de maduración del bacteriófago T7 .....	73
<b>5.3</b> Mecanismos generales de estabilización de las cápsidas virales .....	74
<b>6</b> <b>Conclusiones</b> .....	81
<b>7</b> <b>Bibliografía</b> .....	85
<b>8</b> <b>Publicaciones</b> .....	97



## Abreviaturas

<b>3D</b>	Tridimensional ( <i>Three <u>D</u>imensional</i> )
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosina-5´ - trifosfato ( <i>Adenosine-5´ - <u>T</u>ri<u>P</u>hosphate</i> )
<b>ATCC</b>	<i><u>C</u>olección <u>a</u>mericana de <u>t</u>ipos <u>c</u>elulares <u>A</u>merican <u>T</u>ype <u>C</u>ulture <u>C</u>ollection</i>
<b>CCMV</b>	<i><u>C</u>owpea <u>C</u>hlorotic <u>M</u>ottle <u>V</u>irus</i>
<b>crioME</b>	Criomicroscopía electrónica
<b>C-terminal</b>	Extremo carboxilo terminal
<b>CTF</b>	Función de transferencia de contraste ( <i><u>C</u>ontrast <u>T</u>ransfer <u>F</u>unction</i> )
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EDTA</b>	Acido etilendiaminotetraacético ( <i><u>E</u>thylen <u>D</u>iamine <u>T</u>etraacetic <u>A</u>cid</i> )
<b>EMDB</b>	<i><u>E</u>lectron <u>M</u>icroscopy <u>D</u>ata <u>B</u>ank</i>
<b>FSC</b>	<i><u>F</u>ourier <u>S</u>hell <u>C</u>orrelation</i>
<b>HIV-1</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana ( <i><u>H</u>uman <u>I</u>mmunodeficiency <u>V</u>irus, <u>T</u>ype <u>1</u></i> )
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>ME</b>	Microscopía electrónica
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección ( <i><u>M</u>ultiplicity <u>O</u>f <u>I</u>nfection</i> )
<b>MW</b>	Peso molecular ( <i><u>M</u>olecular <u>W</u>eight</i> )
<b>N-terminal</b>	Extremo amino terminal
<b>N<sub>ov</sub></b>	<i><u>N</u>udaurelia <u>c</u>apensis <u>o</u> <u>V</u>irus</i>
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida ( <i><u>P</u>oly<u>a</u>crilammide <u>G</u>el <u>E</u>lectrophoresis</i> )
<b>pb</b>	par de bases
<b>PDB</b>	Base de datos de proteínas ( <i><u>P</u>rotein <u>D</u>ata <u>B</u>ank</i> )
<b>SFM</b>	Microscopía de fuerza ( <i><u>S</u>canning <u>F</u>orce <u>M</u>icroscopy</i> )
<b>SPIDER</b>	<i><u>S</u>ystem for <u>P</u>rocessing <u>I</u>mage <u>D</u>ata in <u>E</u>lectron <u>M</u>icroscopy and <u>R</u>elated <u>F</u>ields</i>
<b>SSE</b>	Elementos de estructura secundaria ( <i><u>S</u>econdary <u>S</u>tructure <u>E</u>lements</i> )
<b>T</b>	Número de triangulación
<b>TAE</b>	Tampón <u>T</u> ris- <u>A</u> cetato- <u>E</u> DTA
<b>TMV</b>	Virus del mosaico del tabaco ( <i><u>T</u>obacco <u>M</u>osaic <u>V</u>irus</i> )
<b>Tris</b>	Tri-(hidroximetil)-aminometano
<b>Xmipp</b>	<i><u>X</u>-window based <u>m</u>icroscopy <u>i</u>mage <u>p</u>rocessing <u>p</u>ackage</i>





## Summary

The detailed analysis of viral structures by combination and integration of bioinformatics and structural homology approaches have led to the detection of common structural folds among the different viral systems, and therefore, to the deduction of evolutionary relationships among them.

Assembly and maturation of dsDNA phage capsids is a tightly regulated process, at both the genetic and biochemical levels, exhibiting conserved features in all *Caudovirales* and in some eukaryotic viruses such as herpesviruses. It starts by the formation of a precursor particle (prohead) that serves as a container for genome packaging and is simultaneously matured through successive structural transitions, due to a mechanochemical reorganization program, eventually yielding a robust capsid.

The work carried out during this Ph.D. thesis was aimed to elucidate the molecular rearrangements involved in the capsid shell maturation of bacteriophage T7. We have solved the structure of the mature capsid by a combination of single particle cryo-EM three-dimensional reconstruction using icosahedral symmetry and protein modeling. Then, we compared this structure with the T7 procapsid to learn about the molecular basis of this maturation process.

The mature capsid presents an expanded and thinner shell, with a drastic rearrangement of the major protein monomers that increases their interacting surfaces, in turn resulting in a new bonding lattice. The rearrangements include tilting, in-plane rotation, and radial expansion of the subunits, as well as a relative bending of the A- and P-domains of each subunit. The unique features of this shell transformation, which does not employ the accessory proteins, inserted domains, or molecular interactions observed in other phages, suggest a simple capsid assembling strategy that may have appeared early in the evolution of these viruses.



## **1 Introducción**

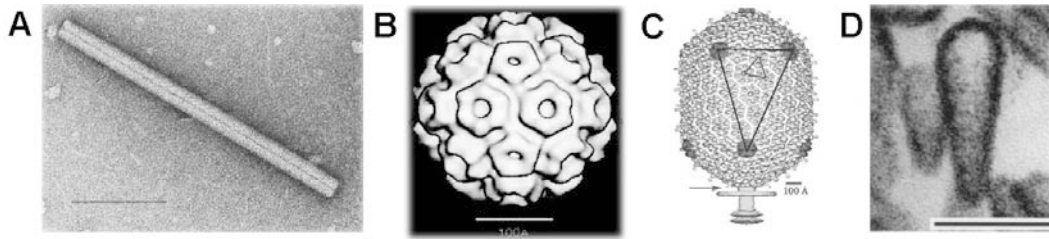


## 1.1 Características generales de los virus

Los virus son la forma de vida más abundante del planeta (Poranen et al, 2002) e infectan prácticamente todos los organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Tienen dos fases en su ciclo de vida: una fase fuera de la célula huésped y otra dentro de esta. Se trata de parásitos intracelulares ya que no tienen la maquinaria completa para la replicación de su genoma y producir las proteínas necesarias para llevar a cabo su ciclo vital. Tras la infección, el genoma viral altera drásticamente el metabolismo de la célula huésped para que ésta comience a sintetizar los componentes del virus. Los virus se ensamblan a partir de un número pequeño de proteínas y son capaces de llevar a cabo múltiples funciones: encapsidar su genoma, abandonar la célula que infectan (fuera de las células los virus pueden sobrevivir en condiciones extremas), proteger el ácido nucleico de agentes externos, reconocer a una célula huésped, mediar la entrada al interior celular y, finalmente, liberar el ácido nucleico en el momento preciso para que la infección proceda.

Las partículas virales infectivas completas se denominan viriones y tienen dos componentes comunes: el material genético y un contenedor, generalmente proteico, al que se denomina cápsida. Presentan sólo un tipo de material genético en forma de ADN o ARN, de cadena simple o doble, circular o lineal. La ruta de replicación en la célula huésped depende del tipo de material genético; por ejemplo, muchos virus de ADN de cadena doble replican su material genético usando la polimerasa de la célula; en cambio los virus ARN de cadena simple y polaridad negativa, requieren una polimerasa viral para transcribir primero el genoma en su complementario de polaridad positiva, que es después legible para la polimerasa de la célula. La cápsida junto con su ácido nucleico se denomina nucleocápsida, aunque este concepto también se utiliza para describir la asociación directa del ácido nucleico viral con proteínas, normalmente implicadas en la replicación. En ciertos casos de virus complejos, la nucleocápsida puede estar recubierta de una envuelta o membrana y otras estructuras (por ejemplo, fibras) que pueden ser de origen celular o viral (Carrasco & Almendral, 2005).

La morfología de las cápsidas virales dependen del tipo de virus, y entre las distintas formas posibles hay cuatro que cubren la mayoría del espectro: helicoidal, cuasi-esférica, baciliforme y cónica (Reddy & Johnson, 2005). Ejemplos típicos de virus con estas morfologías se muestran en la [Figura 1.1](#).



**Figura 1.1: Ejemplos de formas de las cápsidas virales.** **A)** El virus del mosaico del tabaco (TMV), de forma helicoidal. **B)** Reconstrucción tridimensional de la cápsida del virus CCMV (*Cowpea Chlorotic Mottle Virus*), de forma esférica (Zandi et al, 2004). **C)** Reconstrucción tridimensional del bacteriófago T4, de forma prolata (Fokine et al, 2004). **D)** Imagen de microscopía electrónica de la nucleocápsida del HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus, Type 1*), de forma cónica (Ganser et al, 1999).

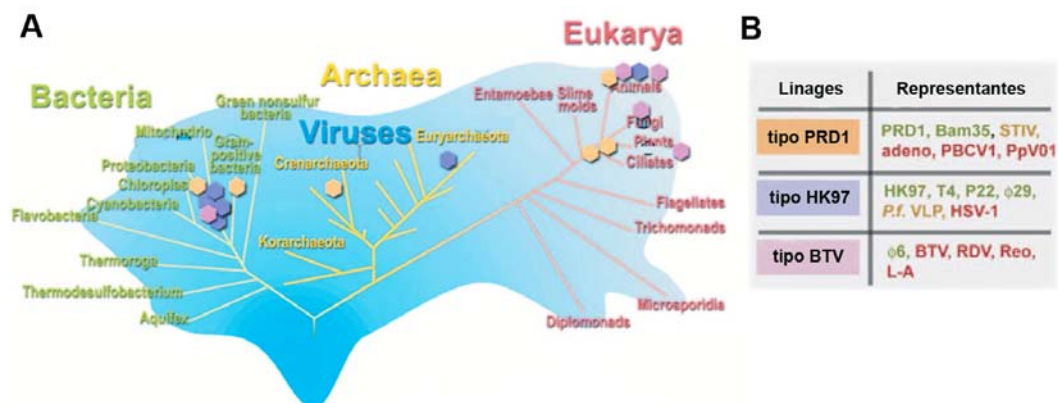
Las cápsidas virales tienen tamaños comprendidos entre decenas y cientos de nanómetros (~ 500 nm en el caso de Mimivirus), y están hechas de copias múltiples de una o varias proteínas que se autoensamblan espontáneamente sin gasto energético.

La combinación entre técnicas estructurales como la difracción de rayos X, la resonancia magnética nuclear, la microscopía de fuerzas atómicas o la microscopía electrónica de transmisión junto con métodos de procesamiento digital de imágenes y reconstrucción tridimensional, ha permitido aumentar considerable en los últimos años el número de estructuras virales resueltas, cubriendo prácticamente todas las familias de virus (Prasad & Schmid, 2012).

## 1.2 Linajes virales: diversidad y conservación

Se ha visto que, a pesar de la divergencia en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos para los distintos tipos de virus, estos forman cápsidas a partir de elementos comunes que definen los linajes estructurales, como se ha demostrado recientemente (Bamford et al, 2005). De esta manera, partículas virales que aparentemente no están relacionadas evolutivamente se pueden agrupar en base a las semejanzas estructurales que presentan las proteínas estructurales de sus cápsidas (Figura 1.2).

En el transcurso de la evolución, los viriones se han diversificado y adaptado a los cambios de los diferentes sistemas celulares infectados. De esta forma podemos observar cómo virus que infectan células muy alejadas en el árbol filogenético pertenecen a un mismo linaje viral. Esto implica que el origen de los virus es muy antiguo, probablemente anterior a la vida celular, y polifilético, a diferencia de las células que tienen un origen monofilético (Bamford, 2003). Observamos cómo, en base a esta clasificación, los virus con cola que infectan bacterias (llamados bacteriófagos o fagos) y el virus del herpes (HSV-1) pertenecen al mismo linaje viral, HK97, encontrándose evolutivamente muy distantes.

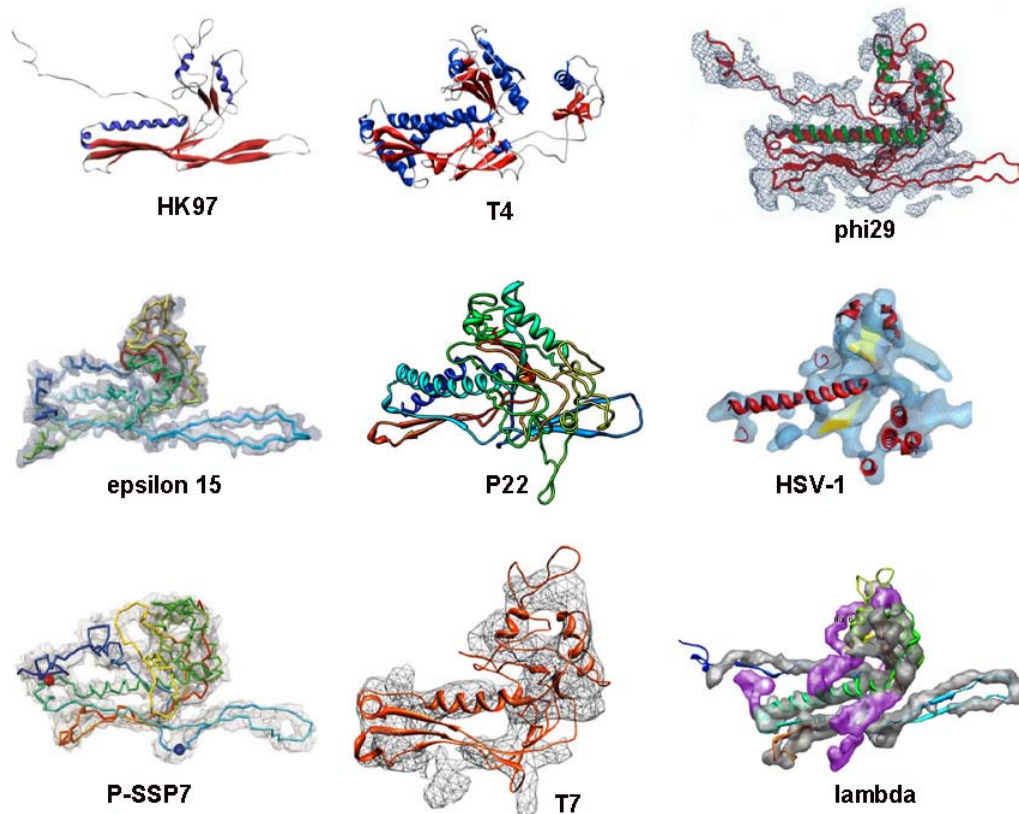


**Figura 1.2: Linajes virales. A)** El árbol filogenético de los organismos vivos en base a las secuencias del rARN, mostrando los tres dominios (en verde, procariotas; en amarillo, arqueas; en rojo, eucariotas y en azul se representan los virus). Algunos ejemplos de los virus, acorde con el organismo que infecta están representados al final de las ramas del árbol. Con hexágonos naranjas se representan los virus del linaje PRD1, con hexágonos azul los virus del linaje HK97 y con hexágonos morados los virus del linaje BTM. **B)** Tabla con los tres linajes virales (tipo PRD1, tipo HK97 y tipo BTM), clasificados en función de la semejanza estructural de la proteína mayoritaria de la cápsida. Para cada linaje se indican ejemplos de organismos. Los colores verde, amarillo y rojo indican si el virus infecta bacterias, arqueas o eucariotas respectivamente. Figura adaptada de Bamford y colaboradores (Bamford et al, 2005).

### 1.2.1 Linaje tipo HK97

La proteína de la cápsida del bacteriófago T7, que es el objeto de estudio de esta tesis, tiene el mismo tipo de plegamiento que la proteína de la cápsida del virus HK97 (Agirrezabala et al, 2007), por lo que nos vamos a centrar en esta familia.

La primera estructura resuelta a nivel atómico de la proteína de cápsida de un virus de este linaje corresponde al bacteriófago que le da nombre el HK97 (Wikoff et al, 2000). Esta estructura evidenció un plegamiento novedoso que, tras la determinación de la estructura de las proteínas mayoritarias de la cápsidas de otros bacteriófagos con cola, se mostró que era común en todos los casos. Además, la estructura de la proteína de la cápsida del virus del herpes (HSV-1), determinada por microscopía electrónica, muestra un plegamiento similar (Figura 1.3). Este tipo de estructura también se ha encontrado en otros virus como P22 (Jiang et al, 2003), T4 (Fokine et al, 2005), Phi29 (Morais et al, 2005), HSV-1 (Baker et al, 2005),  $\epsilon$ 15 (Jiang et al, 2006), T7 (Agirrezabala et al, 2007) o Lambda (Lander et al, 2008), aunque algunos de estos fagos también incorporan dominios adicionales.



**Figura 1.3: Relación estructural de las proteínas de la cápsida tipo HK97.** Figura adaptada de Veesler (Veesler & Cambillau, 2011).

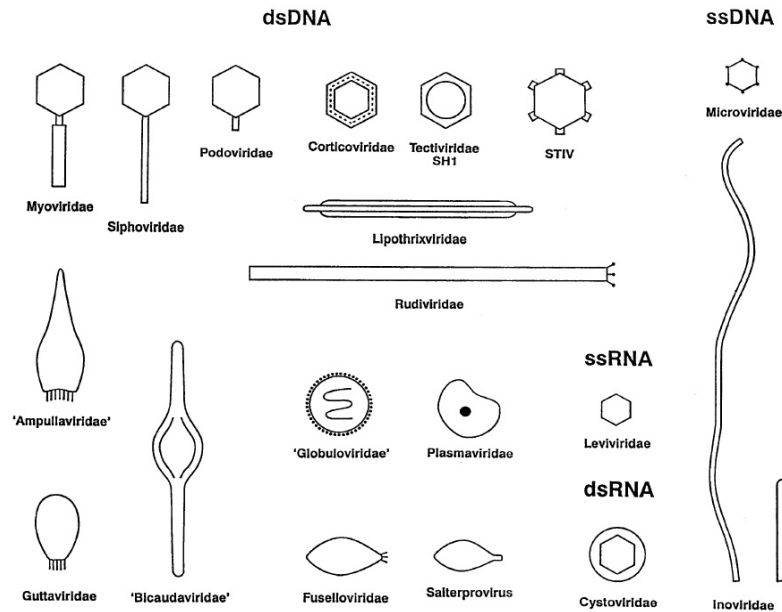
La estructura de la proteína mayoritaria de la cápsida tipo HK97 contiene dos dominios: el dominio P, que está formado por una hélice  $\alpha$  larga y unas tres láminas  $\beta$  largas; y el dominio A, formado por dos hélices  $\alpha$  y un dominio de láminas  $\beta$ .

### 1.3 Bacteriófagos con cola. Características generales

Los bacteriófagos se descubrieron en 1915 por Twort y d'Hérelle (Twort & d'Hérelle, 1915), y son virus que infectan exclusivamente bacterias. Se trata de parásitos intracelulares estrictos ya que su desarrollo se lleva a cabo íntegramente en el interior de la célula hospedadora, a expensas de su maquinaria biológica. A pesar de su simplicidad genética, los bacteriófagos tienen una complejidad estructural y funcional considerable, lo que les ha convertido en sistemas modelo muy adecuado para el estudio de procesos biológicos generales. Además, su importancia práctica en la generación de librerías de péptidos o su potencial como agentes terapéuticos contra bacterias patógenas han reforzado su interés práctico en los últimos años (Cuervo & Carrascosa, 2012). Conocer la estructura de los fagos, entender el mecanismo de interacción con la superficie celular o determinar cómo consigue que la célula use toda su maquinaria de replicación para la propagación del fago, permitiría el diseño de fagos específicos para las infecciones bacterianas.

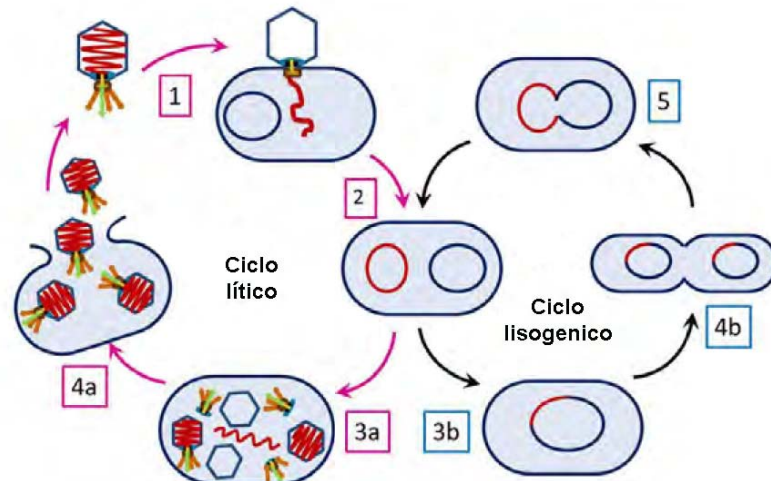


Los fagos forman un grupo heterogéneo y recientemente se han clasificado en función del contenido genómico o de su morfología en 20 familias (Figura 1.4) (Ackermann, 2007).



**Figura 1.4: Morfotipos de bacteriófagos.** Figura adaptada de Ackermann (Ackermann, 2007).

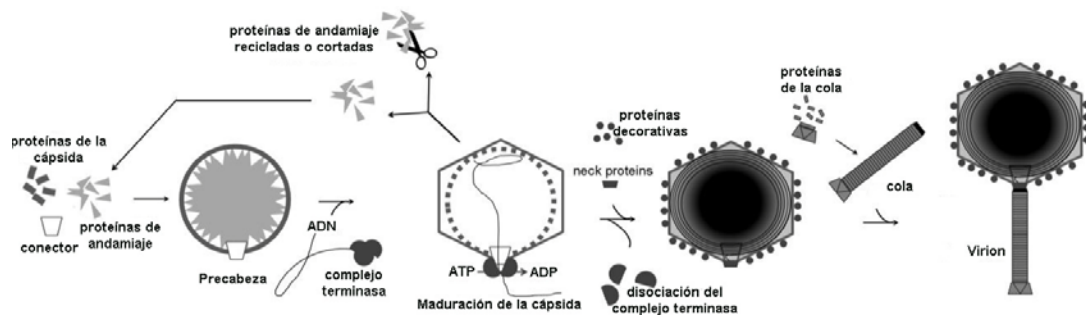
En función del mecanismo de infección, todos los fagos pueden dividirse en dos grupos; un grupo caracterizado por un ciclo lítico de infección mientras que el otro grupo tendría un ciclo de infección lisogénico (Figura 1.5).



**Figura 1.5: Ciclos en la reproducción de los bacteriófagos.** 1- El fago se une a la célula e inyecta su ADN. 2- El ADN del fago entra en ciclo lítico o lisogénico. 3a- Se sintetiza el ADN y las proteínas estructurales, a partir de las cuales se ensamblan los viriones. 4a- Las células se lisan y los fagos se liberan; 3b y 4b- Pasos del ciclo lisogénico: el genoma del fago se integra en el cromosoma bacteriano (se convierten en profagos). La bacteria sufre su ciclo normal de división. 5- En determinadas condiciones el profago queda excluido del cromosoma bacteriano e inicia el ciclo lítico.

Un 96% de los bacteriófagos descritos presentan cola y forman el orden *Caudovirales*.

(Brussow & Hendrix, 2002). La formación de los bacteriófagos con cola es un proceso secuencial y unidireccional, que se resume en varias etapas, como se muestra en la [Figura 1.6](#): (I) Formación de una precabeza usando como componentes principales las proteínas de la cápsida, el conector y la proteína de andamiaje. (II) Empaquetamiento del ADN en el interior de la precabeza usando la energía liberada de la hidrólisis de ATP. Un motor molecular se encarga de la translocación del ADN viral en el interior de la precabeza, y este motor está formado en la mayoría de los bacteriófagos por tres componentes: el conector y dos subunidades de terminasa. (III) Maduración hacia una cápsida poliédrica; un proceso que ocurre simultáneamente con el empaquetamiento del ADN. (IV) Unión de la cola a esta cápsida madura y generación del virión (Aksyuk & Rossmann, 2011).

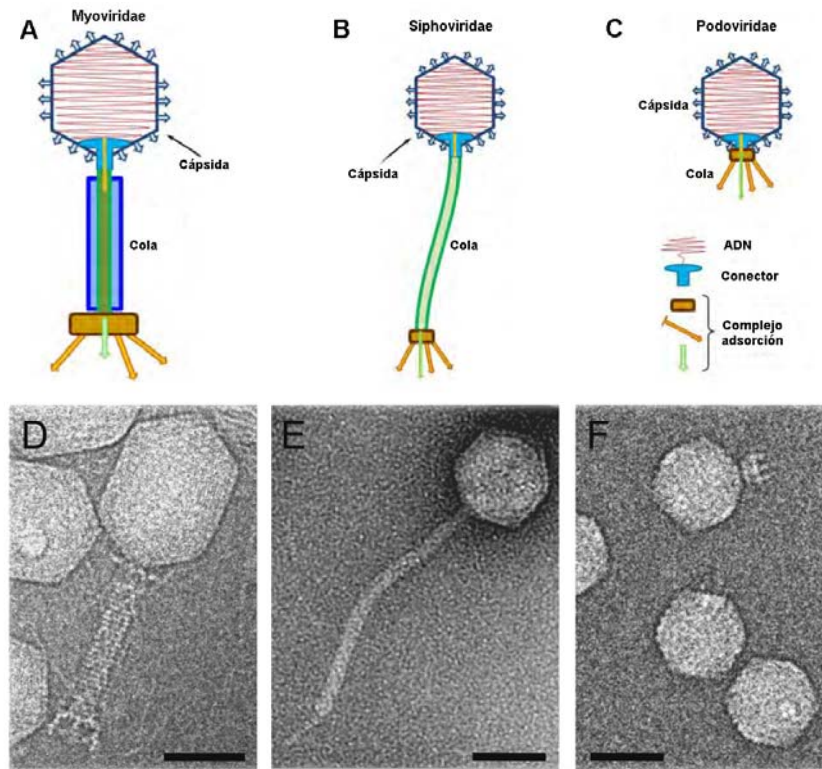


**Figura 1.6: Ruta de ensamblaje genérica de los bacteriófagos con cola.** Figura adaptada de (Aksyuk & Rossmann, 2011).

Así pues, las partículas infectivas serán el producto final de una ruta morfogenética compleja y bien regulada tanto a nivel genético como bioquímico (Veesler & Johnson, 2012).

Dependiendo de la morfología de la cola, los *Caudovirales* están repartidos en tres familias distintas ([Figura 1.7](#)): un 25% forman la familia *Myoviridae* que contiene bacteriófagos de cola larga contráctil (por ejemplo T4, P2, Mu); un 61% forman la familia *Siphoviridae*, bacteriófagos de cola larga no contráctil (por ejemplo  $\lambda$ , SPP1, T5, HK97) y el 14% restante forman la familia *Podoviridae*, caracterizados por presentar colas cortas no contráctiles (por ejemplo P22, T7, phi29) (Ackermann, 2003).

En cualquiera de los casos, la cola se ensambla en un solo vértice del icosaedro y contiene tanto elementos necesarios para el reconocimiento del receptor bacteriano (específico de cada fago), como también componentes para la eyección del genoma del virión en el citoplasma bacteriano. De hecho, recientemente se ha sugerido que las similitudes entre las colas virales y ciertas maquinarias bacterianas insertadas en su pared (como los sistemas de secreción de bacteriocinas) representan una interesante solución convergente para la translocación macromolecular y/o una posible forma de transferencia genética entre microorganismos (Veesler & Cambillau, 2011).



**Figura 1.7: Bacteriófagos del orden Caudovirales.** **A)** Representación esquemática de los virus de la familia Myoviridae. **B)** Representación esquemática de los virus de la familia Siphoviridae. **C)** Representación esquemáticas de los virus de la familia Podoviridae. **D)** Bacteriófago T4 (Rossmann et al, 2004). **E)** Bacteriófago SPP1 (Lurz et al, 2001). **F)** Bacteriófago P22 (Chang et al, 2006). Las barras de escala corresponden a 50 nm. Figura adaptada de (Orlova, 2012).

Las colas contienen un canal central que permite el paso del ADN en el momento de la eyección. La longitud de las colas varía desde 30 nm en P22 a 455 nm en el caso del bacteriófago G (Aksyuk & Rossmann, 2011). La mayoría de estas estructuras tienen simetría de orden 6 y forma helicoidal (Cuervo & Carrascosa, 2012).

Las cápsidas son estructuras poliédricas muy estables, mayoritariamente icosaédricas, compuestas por múltiples copias de la misma proteína, llamada proteína mayoritaria de la cápsida.

Como esta tesis se centra en determinar los cambios estructurales que experimenta la cápsida del bacteriófago T7 en su proceso de maduración morfogenética, analizaremos más en detalle, primero de los bacteriófagos en general y luego, para el caso de T7 en particular, la transición entre precabeza y virión.

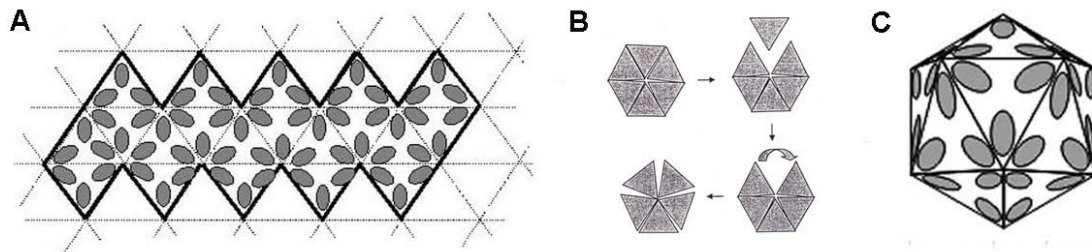
## 1.4 Cápsidas icosaédricas. Ensamblaje y maduración

De entre los distintos tipos de cápsidas, las cuasi-esféricas son las más abundantes y, a pesar de la variabilidad de tamaño, las proteínas que las forman están organizadas siguiendo

unas reglas estrictas de simetría icosaédrica. Las cápsidas icosaédricas pueden tener una forma isométrica como los fagos P22 (Chen et al, 2011), lambda (Lander et al, 2008), T7 (Agirrezabala et al, 2005a), P4 (Dokland et al, 2002), HK97 (Wikoff et al, 2000), SPP1 (White et al, 2012) o elongada como T4 (Fokine et al, 2005) o Phi29 (Morais et al, 2005).

### 1.4.1 Principios geométricos de la simetría icosaédrica

La estructura icosaédrica viral más sencilla está formada por 60 subunidades y los contactos entre estas subunidades son idénticos. Sin embargo, la mayoría de las cápsidas tienen más de 60 subunidades, aunque geométricamente sea imposible construir un icosaedro con mas 60 unidades manteniendo contactos iguales entre ellas. Caspar y Klug propusieron la hipótesis de la cuasi-equivalencia para justificar la existencia de subunidades que pueden mantener contactos casi iguales (Caspar & Klug, 1962). En otras palabras, existe una cierta flexibilidad en los contactos intersubunidades que implica ligeras variaciones en la estructura tridimensional de las subunidades proteicas y en su patrón de interacciones. El icosaedro se puede generar a partir de una red plana hexagonal mediante la conversión de los nodos hexagonales o hexámeros (planos) en pentagonales o pentámeros (convexos) mediante la eliminación de una de las subunidades (Figura 1.8) (Carrasco & Almendral, 2005). De esta manera, se introduce una curvatura en la red hexagonal que permite la formación de una estructura cerrada.

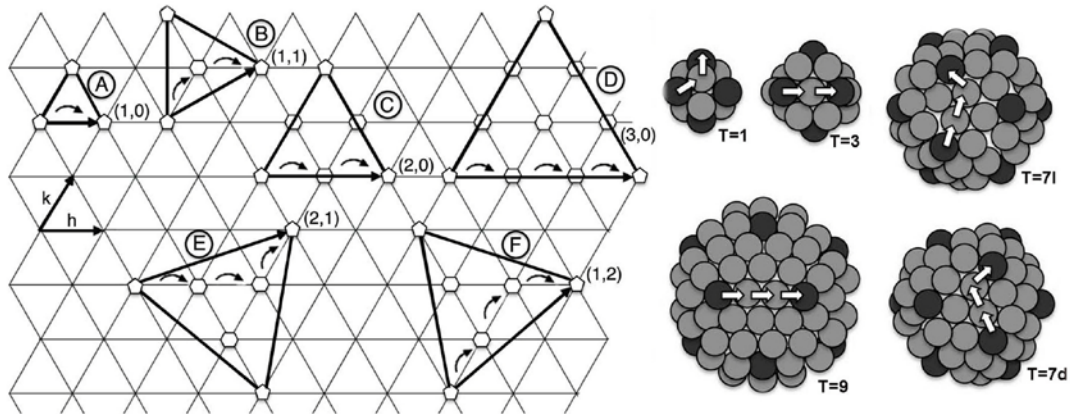


**Figura 1.8: Construcción de icosaedros a partir de una red plana hexagonal.** A) Subunidades distribuidas en las caras triangulares formadas por la red. B) Representación del proceso por el cual un hexámero puede, mediante la pérdida de una subunidad y reorganización de las restantes, convertirse en un pentámero. C) El icosaedro generado a partir de la red hexagonal.

La relación que define los icosaedros posibles a partir de una red hexagonal es el llamado **número de triangulación (T)**, que coincide con el número de triángulos de la red plana elemental que contiene cada cara del icosaedro. Los virus más pequeños se acomodan al modelo  $T=1$ , mientras que los virus icosaedros mas grandes pueden tener números de  $T= 3, 4, 7, 9, \dots$  etc. El numero de triangulación viene dado por la relación  $T= h^2+hk+k^2$ , donde  $h$  y  $k$  son números enteros que definen la posición de los pentones en la red hexagonal original (Figura 1.9).

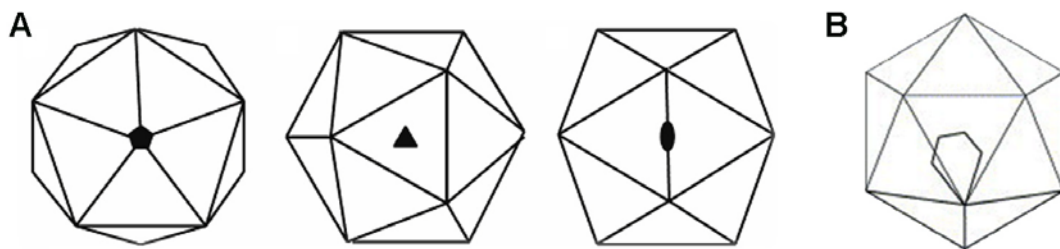
Las cápsidas icosaédricas presentan tres clases de ejes de simetría rotacional (Figura 1.10A): de orden 5, 3 y 2. Los ejes de orden 5 conectan el centro de la cápsida con cada uno de los 12 vértices del icosaedro; los ejes de orden 3 atraviesan los centros de cada triángulo equilátero que

forman las 20 caras del icosaedro y los ejes de orden 2 pasan por el centro de cada una de las 30 aristas del icosaedro. Por ello, el icosaedro es un sólido con una simetría rotacional 5-3-2.



**Figura 1.9: Determinación del número de triangulación, T.** Ejemplos de diferentes triangulaciones mostradas en plano (a la izquierda) y en representación tridimensional (a la derecha). En la red hexagonal, los capsómeros están localizados en las intersecciones de las coordenadas: la posición de los hexámeros y pentámeros están marcados con pequeños polígonos. La cara triangular del icosaedro se indica con una línea gruesa. En el caso **A**, un pentámero está separado del siguiente más próximo por un paso (marcado con flecha pequeña), a lo largo del eje del vector  $h$ . Por tanto,  $h=1$ ,  $k=0$  y  $T=1$ . En el caso **B**, los pentámeros están separados por un paso a lo largo del eje del vector  $h$  y otro a lo largo del  $k$ . Por tanto,  $h=1$ ,  $k=1$  y  $T=3$ . En **D**,  $h=3$ ,  $k=0$  y  $T=9$ . En el caso en cual  $h$  y  $k$  tienen valores distintos (**E** y **F**), la cápsida es quiral. En una red  $T=7l$  (laevo), caso **E**, se realizan 2 pasos en la dirección del eje  $h$  y uno hacia la izquierda en la dirección del eje  $k$ . Figura adaptada de (Carrasco & Almendral, 2005).

Un concepto importante que resulta de la triangulación es la unidad asimétrica del icosaedro (Figura 1.10B). El eje de simetría rotacional de orden 3 atraviesa el centro de la cara del icosaedro dividiendo las subunidades de dicha cara en tres partes equivalentes. Cada una de estas partes forma la unidad asimétrica del icosaedro ya que al imponerle simetría rotacional 5-3-2, permite generar las  $60T$  unidades del icosaedro.



**Figura 1.10: A) Los ejes de simetría rotacional de un icosaedro.** Se muestran vistas del icosaedro desde sus ejes de simetría 5, 3 y 2 (de izquierda a derecha). **B)** Representación esquemática de la unidad asimétrica de un icosaedro.

Caspar y Klug mostraron que la simetría icosaédrica es la forma más eficaz de ensamblaje, ya que presenta un mayor volumen en relación con su superficie. En las cápsidas icosaédricas tenemos dos tipos de capsómeros: capsómeros pentaméricos o pentones, formados por cinco

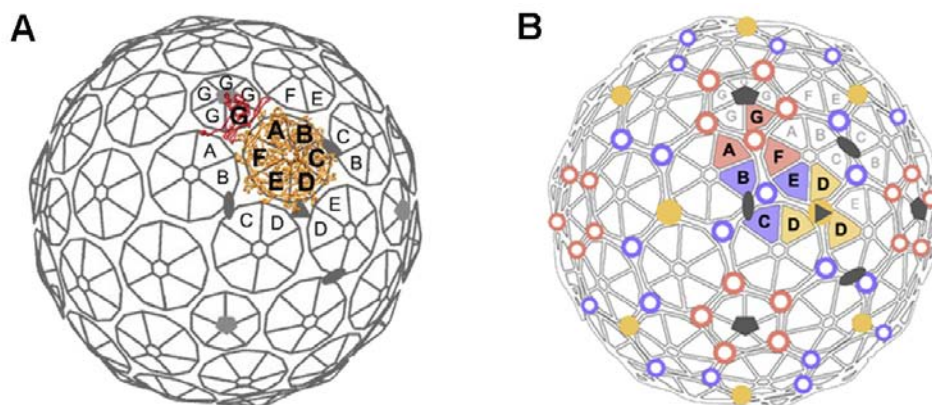


unidades proteicas y localizados en cada uno de los 12 vértices del icosaedro, y capsómeros hexaméricos o hexones, que están formados por 6 unidades proteicas y se distribuyen en las caras y las aristas del icosaedro.

El polimorfismo que implica la cuasi-equivalencia (conformaciones espaciales) no sólo juega un papel básico en la estructura de la cápsida, sino que es fundamental en el proceso de maduración, ya que permite los cambios *in situ* requeridos en dicho proceso morfogénico.

Las subunidades proteicas que forman la partícula interactúan entre sí mediante enlaces no covalentes y en general, débiles. Sin embargo, existen excepciones como el bacteriófago HK97, donde se ha descrito el uso de enlaces covalentes entre las subunidades que forman la cápsida (Wikoff et al, 2000). En la inmensa mayoría de los casos, la estabilidad de la partícula viral se consigue a través de la cooperación de una gran cantidad de interacciones de tipo iónico e hidrofóbico.

La mayoría de los bacteriófagos con cola tienen una cápsida con una simetría  $T = 7$  (Baker et al, 1999), como es el caso del fago T7 que se estudia en este trabajo. Observamos en la [Figura 1.11](#) un esquema de las interacciones que se dan en una cápsida icosaédrica con  $T=7$ . Estos sitios de interacción serán los considerados a la hora de caracterizar las interacciones que estabilizan la cápsida en este estudio.



**Figura 1.11: Organización de las cápsidas icosaedricas con  $T=7$ .** **A)** Se representa la unidad asimétrica formada por las seis subunidades (A-F) de un hexón (en naranja) y una subunidad G (en rojo) de un pentón. **B)** Representación esquemática de los tres tipos de contactos equivalentes (DDD- los puntos amarillos) y cuasi-equivalentes (AFG—círculos rojos y BCE—círculos azules).

El proceso de formación de la cápsida es complejo y debe conciliar dos aspectos aparentemente contradictorios. Por una parte, debe tener unos requerimientos energéticos mínimos que asegure una alta eficacia de ensamblaje y, por otra, debe conducir a la formación de un contenedor lo suficientemente resistente frente a las condiciones agresivas del medio extracelular. La formación de una cápsida altamente estable se consigue tras un proceso de maduración que se realiza *in situ*, manteniendo la integridad de la partícula, y se lleva a cabo mediante una reorganización de contactos entre las subunidades proteicas que sufren una serie de transiciones conformacionales concertadas que generan una partícula funcional e infectiva. Un aspecto que se debe resaltar es que no existe un gasto energético directamente acoplado en

todo este complejo proceso de formación del virión, excepto en el proceso de empaquetamiento del ADN en las precabezas. Además el proceso morfogenético es unidireccional. Se ha comprobado aplicando fuerzas puntuales mediante microscopia de fuerzas (scanning force microscopy, SFM) que las cápsidas virales poseen complejas propiedades mecánicas (Ivanovska et al, 2004) y son capaces de soportar fuerzas del rango de nanonewtons sin sufrir roturas, variando sus propiedades elásticas a lo largo de la superficie.

#### 1.4.2 El ensamblaje y la estructura de las precabezas

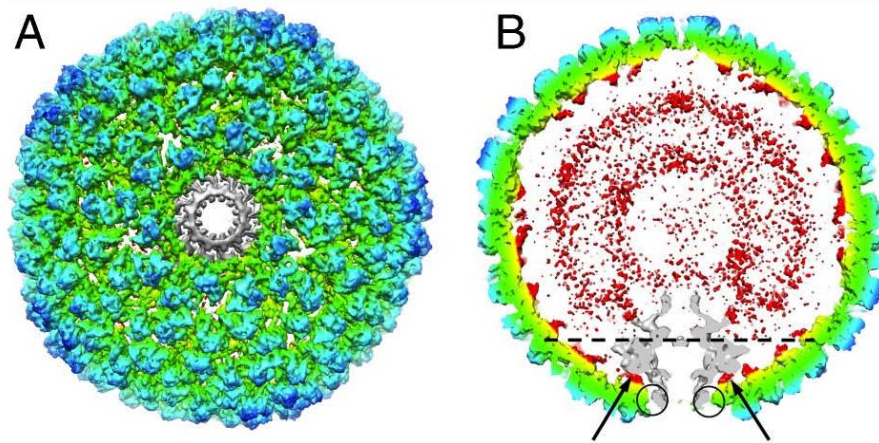
La precabeza es una estructura vírica cuya formación requiere la presencia de unos elementos fundamentales comunes a todos los bacteriófagos con cola, como son las proteínas de la cápsida, el conector y las proteínas de andamiaje. Además de estos componentes, para cada caso particular, la precabeza puede tener elementos suplementarios.

Se ha descrito que la proteína de la cápsida recién sintetizada se puede encontrar en forma de capsómeros, como es el caso de los fagos HK97 o T4, o en forma de monómeros, en el caso de P22, Phi 29 o HSV-1 (Veesler & Johnson, 2012). Por si sola, la proteína de la cápsida no puede formar una cápsida y requiere la presencia de una o varias proteínas de andamiaje (Fane & Prevelige, 2003). Las proteínas de andamiaje catalizan los pasos que tienen lugar durante la formación de los complejos macromoleculares asegurando la fidelidad del proceso y previniendo la formación de interacciones erróneas, actuando de un modo similar a las chaperonas moleculares en el plegamiento de las proteínas (Dokland, 1999). La mayoría de los fagos tienen un gen que codifica para la proteína de andamiaje, excepto los bacteriófagos T5 y HK97 que tienen unos dominios de andamiaje en el gen de la proteína de la cápsida (Duda et al, 1995b); (Huet et al, 2010). Por su parte, el bacteriófago T4 tiene seis proteínas de andamiaje (Aksyuk & Rossmann, 2011). La proteína de andamiaje se localiza en el interior de la precabeza y no sigue la simetría icosaédrica que presenta la cápsida. Una proteína de andamiaje defectuosa o ausente daría lugar a estructuras aberrantes, así por ejemplo, en el caso phi29 una mutación da lugar a cápsidas isométricas en lugar de prolatas (Choi et al, 2006). La ausencia de esta proteína en T4 o lambda hace que se formen estructuras cilíndricas (Aksyuk & Rossmann, 2011). Estudios recientes del bacteriófago P22 han mostrado interacciones entre la proteína de andamiaje con el dominio N-terminal de la proteína de la cápsida y con el conector, lo que sugiere un papel fundamental en la iniciación y la formación de la cápsida (Chen et al, 2011). El bacteriófago T7 se puede ensamblar en policápsidas cuando la estequiometría entre la proteína de andamiaje y la proteína de la cápsida es de 0,11:1 (Cerritelli & Studier, 1996).

Otro elemento fundamental en la formación de la precabeza es el conector, que se encuentra en un vértice pentamérico de la cápsida. El conector es necesario tanto para el empaquetamiento y la futura eyección del ADN, como para la incorporación de las proteínas de la cola a la cápsida. Además, se considera el centro de nucleación en la formación de la precabeza (Valpuesta & Carrascosa, 1994). A pesar de su baja homología de secuencia, conectores de diferentes sistemas virales determinados por cristalografía de rayos X o

microscopía electrónica presentan una arquitectura común de hélices  $\alpha$  agrupadas formando un canal central (Cuervo & Carrascosa, 2011). Algunos fagos, como HK97 o T7, pueden formar precabezas en ausencia del conector, pero evidentemente estas precabezas no son capaces de empaquetar el ADN.

Las precabezas icosaédricas tienen forma aproximadamente redondeada y un tamaño característico para cada fago. En los ejes de simetría 5 se localizan capsómeros pentaméricos, mientras que las caras están formadas por capsómeros hexaméricos. Los hexámeros tienen una distribución elíptica con una pseudosimetría 2. En uno de los vértices, un pentámero es sustituido por el conector (Figura 1.12).



**Figura 1.12: Reconstrucción asimétrica de la precabeza del fago P22.** A) La densidad está coloreada radialmente y se muestra el eje de simetría 5 donde está el conector. B) Sección central en la precabeza de P22 mostrando en rojo la proteína de andamiaje y en gris el conector. Figura adaptada de Chen y colaboradores (Chen et al, 2011).

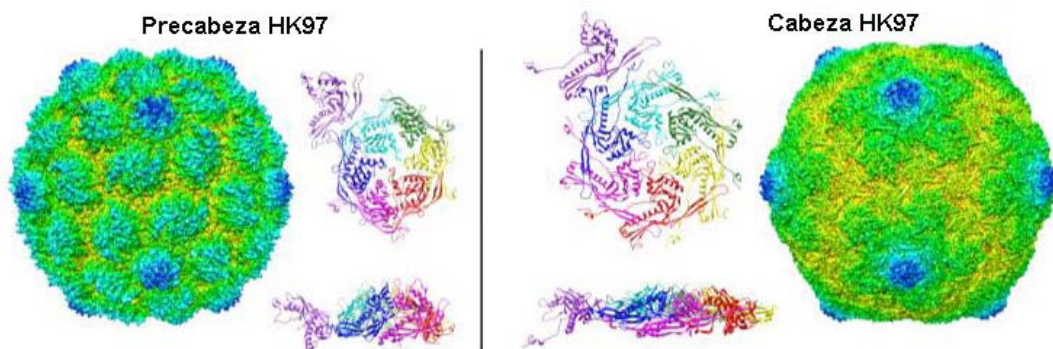
En las reconstrucciones tridimensionales de precabezas, obtenidas sin aplicar simetría, se pueden apreciar elementos singulares como son el conector, la proteína de andamiaje en el interior de la cápsida, o la interacción entre el conector, la cápsida y la proteína de andamiaje (Figura 1.12B). Se considera que esta interacción entre la proteína de la cápsida, el conector y la proteína de andamiaje juega un papel fundamental en el proceso de formación de una precabeza de forma y tamaño adecuados (Chen et al, 2011).

### 1.4.3 La transición precabeza-cabeza madura

Por el proceso de maduración de un bacteriófago se entiende la transición de la partícula no infectiva o precabeza, hacia una partícula infectiva llamada cabeza madura o virión (Veesler & Johnson, 2012). *In vivo*, el empaquetamiento del ADN desencadena la maduración de la precabeza y estos dos procesos ocurren simultáneamente dando lugar a una estructura más grande, más estable y de paredes más finas; además, esta transformación implica generalmente una expansión, que puede llegar a producir un aumento de volumen de hasta el 50%. No obstante existen algunos ejemplos en los que no ocurre ese aumento de tamaño, así la precabeza



de HSV-1 sufre importantes cambios estructurales en el proceso de maduración pero mantiene sus dimensiones (Trus et al, 1996); o incluso, en el caso de la precabeza del virus de RNA Nudaurelia capensis  $\omega$  (Nov), reduce su tamaño con la maduración (Canady et al, 2000). Durante o después del empaquetamiento, la proteína de andamiaje puede ser expulsada a través de la cápsida (P22, Phi29) o puede ser eliminada mediante un proceso de proteólisis, como es el caso de HK97 o T4. La liberación de la proteína de andamiaje podría estar inducida por la interacción con el ADN, posiblemente a través del dominio “leucine-zipper”, que fue identificado en el fago Phi29 (Morais et al, 2003). En el fago T4, el conector controla la expansión de la cápsida; esta expansión es necesaria para dar cabida a la totalidad del ADN, pero no es indispensable para iniciar el proceso de empaquetamiento (Ray et al, 2009). La expansión de la cabeza además conlleva un cambio en el aspecto de los capsómeros hexaméricos (Figura 1.13). En la mayoría de los fagos, los hexámeros tienen una pseudo simetría 2 en las precabezas y una simetría 6 en las cabezas (Cerritelli et al, 2003); (Gertsman et al, 2009). En el bacteriófago P22 los capsómeros tienen un agujero central por donde la proteína de andamiaje podría salir (Parent et al, 2010); (Prasad et al, 1993).



**Figura 1.13: Maduración de la cápsida de HK97 a nivel de la cápsida y a nivel de los capsómeros.** Figura adaptada de (Aksyuk & Rossmann, 2011).

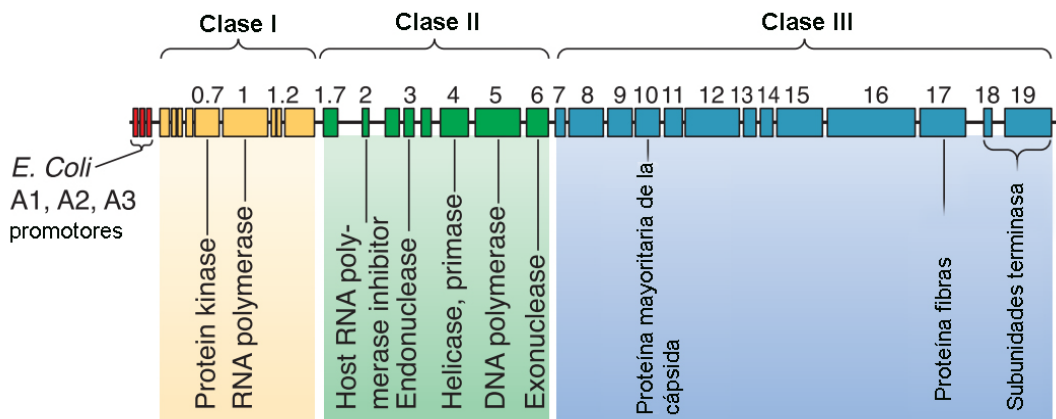
Los bacteriófagos han desarrollado diferentes estrategias para estabilizar su cápsida y poder soportar de esta manera tanto las condiciones extremas que pueden encontrar en su ciclo de vida, como la presión generada por la alta condensación del ADN en el interior de la cápsida. Recientemente se han publicado varias revisiones que describen los mecanismos implicados en estabilizar las cápsidas de los bacteriófagos (Aksyuk & Rossmann, 2011); (Veesler & Johnson, 2012). El más común es la incorporación de proteínas accesorias que forman contactos adicionales, reforzando de esta manera los propios contactos de la cápsida icosaédrica. Es el caso por ejemplo, de los bacteriófagos T4 (Fokine et al, 2004) o epsilon15 (Jiang et al, 2008). En otros virus, como Phi29 (Morais et al, 2005), las proteínas que forman la cápsida tienen dominios adicionales y estos dominios están directamente involucrados en aumentar la estabilidad. El bacteriófago HK97 presenta un mecanismo único de estabilización de su cápsida mediante la formación de enlaces covalentes entre subunidades adyacentes (Conway et al, 2001).

## 1.5 El bacteriófago T7

### 1.5.1 Morfogénesis y ensamblaje

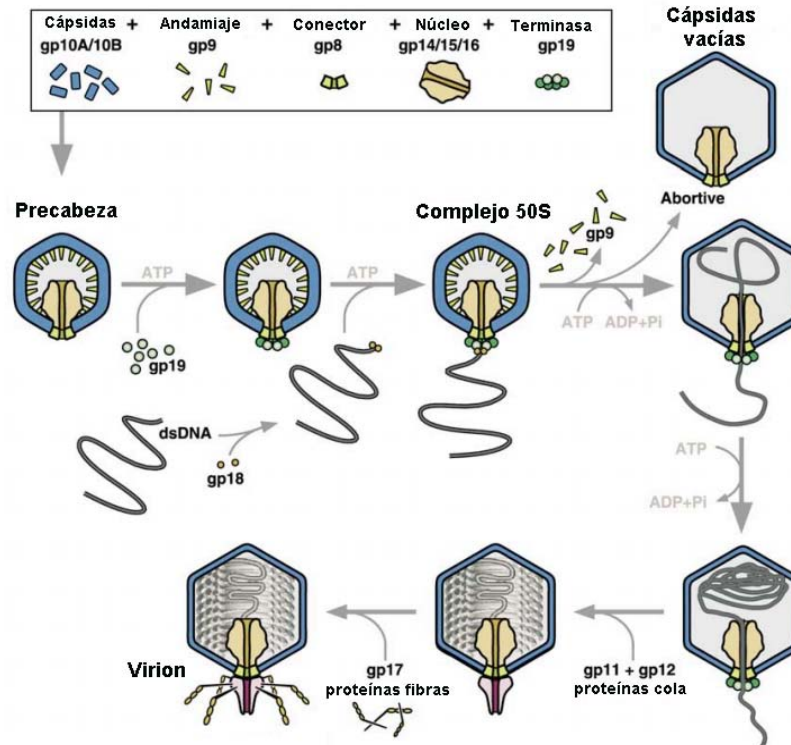
T7 es un bacteriófago con cola corta de la familia *Podoviridae* y depende para propagarse de su huésped *Escherichia coli*. Es un fago de ciclo lítico y libera, en condiciones óptimas, más de 100 fagos progenie por célula en aproximadamente 25 minutos.

El genoma de cadena doble de ADN de T7 tiene 39.937 pb (Figura 1.14). La clase I de genes, de expresión temprana en la infección, establecen las condiciones favorables para el desarrollo del virus; la clase II se expresan después y son las que codifican principalmente las proteínas implicadas en la replicación del ADN. Por último, se expresan los genes de la clase III que codifican las proteínas estructurales del virus.



**Figura 1.14: Mapa genética del bacteriófago T7.** El DNA de T7 está representado por una línea negra. Los rectángulos representan genes o promotores.

La formación del bacteriófago T7 sigue las características generales de la ruta morfogénica de los bacteriófagos con cola y está representada en la Figura 1.15. Empieza con la formación de la precabeza, cuyo ensamblaje requiere el conector (gp8), que constituye el punto de nucleación (Valpuesta & Carrascosa, 1994); la proteína de andamiaje (gp9) y la proteína de la cápsida (gp10).



**Figura 1.15: Ruta de ensamblaje del bacteriofago T7.** Figura adaptada de Cerritelli y colaboradores (Cerritelli et al, 2003).

En primer lugar, el gen 10 codifica la proteína de la cápsida y presenta dos isoformas gp10A (un 90%) y gp10B (un 10%). Estas isoformas se diferencian en una extensión añadida durante la traducción en el C-terminal (de 52 aminoácidos). La ausencia de gp10B conduce a cápsidas formadas solo por gp10A pero que son igual de estables que las las nativas (Condrón et al, 1991a); (Condrón et al, 1991b). A estos componentes se le añade a continuación una estructura peculiar denominada núcleo o core, formada por tres proteínas: gp14, gp15 y gp16 (Serwer, 1976).

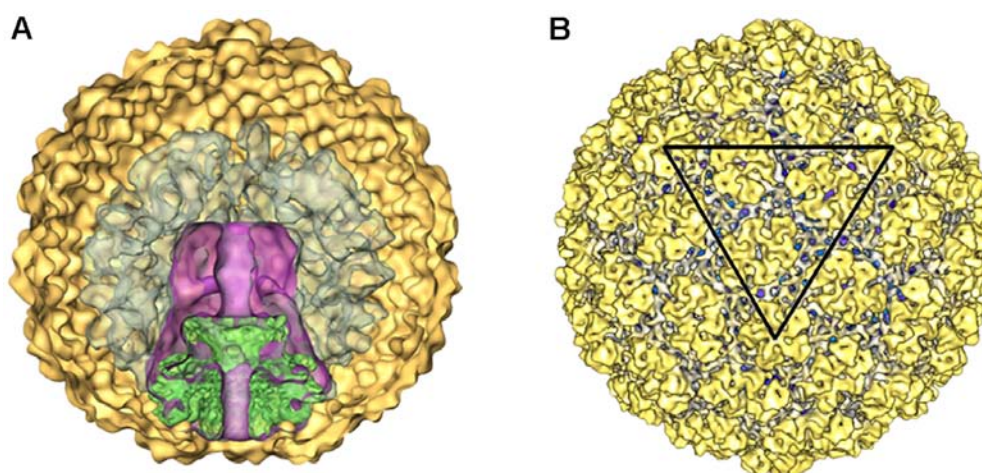
Una vez generada la precabeza, la subunidad mayor del complejo terminasa (gp19) interacciona con el conector en presencia de ATP (Yamagishi et al, 1985); (Fujisawa & Morita, 1997), y la subunidad menor del complejo terminasa (gp18) se une específicamente al ADN (Shibata et al, 1987a; Shibata et al, 1987b) y juntas empaquetan el genoma concatémico de forma lineal. En este punto se libera la proteína de andamiaje a través de los orificios existentes en la parte central de los hexámeros (Prasad et al, 1993) y la precabeza comienza un proceso de expansión pudiendo dar lugar a cápsidas vacías o abortivas (cuando el ADN no entra en el interior de la cápsida) o bien a cápsidas que van a empaquetar correctamente el ADN, transformándose en partículas infectivas. Finalmente las proteínas que forman la cola, gp11 y gp12, se unen a la cápsida de forma cooperativa una vez empaquetado el genoma (Matsuo-Kato et al, 1981). Para dar lugar al virión infectivo, se produce el ensamblaje final de gp17, que da lugar a las fibras proteicas responsables del reconocimiento de la superficie celular (Steven et al, 1988). Se ha descrito la presencia de al menos dos proteínas más en el interior de la cápsida, gp13 y gp7.3, que juegan algún papel en la infectividad pero el número de copias y el sitio donde

se localizan no están bien determinados (Roeder & Sadowski, 1977; Molineux, 2001). Cabe destacar como aspecto importante en el caso de T7, la ausencia de las proteasas implicadas en el proceso de maduración.

El conector, que es el producto del gen 8 (Hendrix, 1978), es la estructura homooligomérica situada en uno de los vértices de simetría 5 de la cápsida, que conecta la cabeza y la cola de los bacteriófagos. La estructura del conector del bacteriófago T7 se ha resuelto a 8 Å de resolución (Agirrezabala et al, 2005b) y muestra la presencia de un motivo  $\alpha$ - $\beta$  responsable de la formación del canal de paso para el ácido nucleico. Este motivo está conservado en conectores de varios sistemas virales como Phi29, T3, T4, SPP1, P22,  $\epsilon$ 15, a pesar de que no presentan homología de secuencia (Cuervo & Carrascosa, 2011). El core se extiende desde el conector hacia el interior de la cápsida y está formado por cuatro copias de la proteína gp16 (143,84 kDa), ocho copias de gp15 (84,21 kDa) y unas 12 copias de gp14 (20,83 kDa). El papel de esta estructura no se conoce muy bien pero se ha demostrado que no es esencial en la morfogénesis (Roeder & Sadowski, 1977), aunque sí lo es en la infectividad del virión maduro (García & Molineux, 1996).

### 1.5.2 Estructura y detalles moleculares de la precabeza de T7

En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha determinado y analizado la estructura de la precabeza del bacteriófago T7 a media y alta resolución (Agirrezabala et al, 2005a); (Agirrezabala et al, 2007). La reconstrucción tridimensional sin imponer ningún tipo de simetría reveló, con una resolución de 2,4 nm, elementos de la precabeza que no siguen la simetría de la cápsida, como el conector, el core o la proteína de andamiaje (Figura 1.16A) (Agirrezabala et al, 2005a).



**Figura 1.16: Organización de la precabeza de T7. A)** Volumen seccionado de las reconstrucciones superpuestas de la cápsida (con simetría 5, en amarillo), el core (reconstruido con simetría 4, en magenta) y el conector (con simetría 12, en verde). El complejo núcleo – proteína de andamiaje reconstruida sin aplicar simetría se muestra en gris transparente. Figura de (Agirrezabala et al, 2005a). **B)** Densidad de la cápsida reconstruida con simetría icosaédrica. El triángulo delimita una cara del icosaedro. Figura de (Agirrezabala et al, 2007).



La densidad reconstruida muestra una cápsida con una estructura T=7l y unas características que concuerdan con las descritas previamente para las precabezas reconstruidas partiendo de la co-expresión de las proteínas gp9 y gp10 (Cerritelli et al, 2003). La cápsida tiene un diámetro de unos 51 nm, un grosor medio de 4-5 nm y una superficie muy corrugada (Figura 1.16). Los hexámeros tienen una distribución sesgada y unas cavidades centrales, mientras que los pentámeros presentan una simetría 5 y no parecen tener cavidad central (Figura 1.16B). La imposición simetría icosaédrica durante el proceso de reconstrucción de la precabeza permitió alcanzar resolución subnanométrica (0,9 nm) y definir los detalles moleculares de la cápsida (Agirrezabala et al, 2007) . De esta forma, se aisló la unidad estructural de la cápsida y se observó que se parecía a la proteína de la cápsida de HK97. Esto llevó a construir un modelo atómico de la cápsida de T7 en base a la homología de secuencia con HK97. Aunque la proteína de la cápsida de T7 gp10A tiene 345 aminoácidos (aa) y la forma madura de la proteína gp5 de HK97 tiene solo 280 aa (después de ser proteolizados los 103 aa del N-terminal), la comparación de estas dos secuencias muestra similitudes significativas (24% de similitud y 10% de identidad) (Figura 1.17). La estructura de HK97 se usó para obtener un modelo atómico del fragmento Pro76-Glu345 de la proteína gp10A de T7 y un modelo pseudoatómico para la cápsida entera. En este modelo faltan los dominios flexibles correspondientes al N-terminal y al lazo E.

HK97_gp5	104	SLGSDADSAGSLIQPMQIPGIIMPGLRRLTTRDLLAQGRSSNALEYVREEVFTNNADV	163
T7_gp10A	76	PGENLDDKRKDIKHTKVITIDGLLTADVLIIYDIEDAMNHYDVRSEYTSQLG...ESLAM	132
		*	
HK97_gp5	164	A.EKALKPESDITFSKQITANVKTIHVVQASRQVMDDAPMLQSYINNRLMYGLALKEEGQ	222
T7_gp10A	133	AADGAVLAEIAGLCNVESKYNNENIEGLGTATVIETTQNK...ALTDQVALGKEIIAALT	189
HK97_gp5	223	LLNGDGTGDNLEGLNKVATAYDTSLNATGDTRADIHAHAIYQVTESEFSASGIVLNPRDW	282
T7_gp10A	190	KARAALT.KNYVPAADRVF.YCDP.DSYSAILAALMPNAANYAALIDPEKGSIRNVMGF	245
HK97_gp5	283	HNIALLLKDNEGRYIFGGPQAFSTNIMWGLPVVPT..KAQAAGTFTVGGFD.MASQVWDRM	339
T7_gp10A	246	EVVEVPHLTAGGAGTAREG.TTG.QKHVFPANKGEGNVKVAKDNVIGLFMHRSAVGTVKL	303
		*	
HK97_gp5	340	DATVEVSREDRDNFVKNMLTILCEERLALAHYRPTAIKGTFS	383
T7_gp10A	304	RDLALERARRANFQADQIIAKYAMGHGGLRPEAAGAVVFQSGVM	347

**Figura 1.17: Alineamiento de las secuencias correspondientes a las proteínas de la cápsida de los bacteriófagos HK97 y T7.** HK97\_gp5, la proteína mayoritaria de la cápsida de HK97, gp5; T7\_gp10A, la proteína mayoritaria de la cápsida de T7, gp10A. Los asteriscos señalan los residuos Lys169 y Asn356 involucrados en la formación del crosslinking en el caso de HK97. Figura adaptada de Agirrezabala y colaboradores (Agirrezabala et al, 2007).

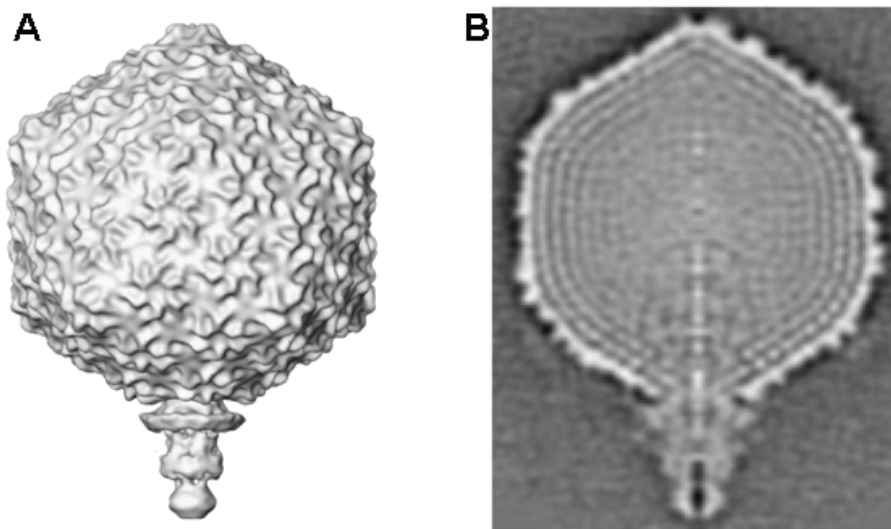
Respecto a la cápsida entera, el mapa de diferencias entre la densidad experimental y el modelo pseudoatómico muestra tres áreas localizadas en los ejes de simetría de orden 3 y pseudo 3, que podrían jugar un papel importante en la estabilización de la precabeza y que corresponderían al dominio lazo E. En la parte interna de la cápsida se han hallado zonas de diferencia que se interpretaron como correspondientes a la región N-terminal (Agirrezabala et al, 2007). El hecho que estas zonas sean similares a las zonas de HK97 donde se localiza la parte

de la proteína gp5 correspondiente al dominio de andamiaje ha permitido concluir que el N-terminal de T7 podría estar implicado en la interacción con la proteína de andamiaje. Un hecho similar se ha visto en el caso del fago P22 (Jiang et al, 2003).

Finalmente hay que señalar que el patrón de las interacciones que se dan en la precabeza de T7 es similar al de la precabeza de HK97 (Wikoff et al, 2000), de forma que en los ejes de simetría 3 y cuasi 3 la interacción del dominio P de una subunidad con el dominio lazo E de otra permite un entrecruzamiento de las subunidades, aunque en este caso es mediante enlaces no covalentes.

### 1.5.3 La maduración de la cápsida de T7 a media resolución

La reconstrucción tridimensional mediante criome del virus maduro, imponiendo simetría 5, ha permitido determinar ciertas características de su cápsida. Esta cápsida presenta una simetría  $T = 7l$ , un diámetro de 60 nm y un grosor de 2 - 2,5 nm. Los hexámeros muestran una simetría 6 no distorsionada (Figura 1.18) (Agirrezabala et al, 2005a).

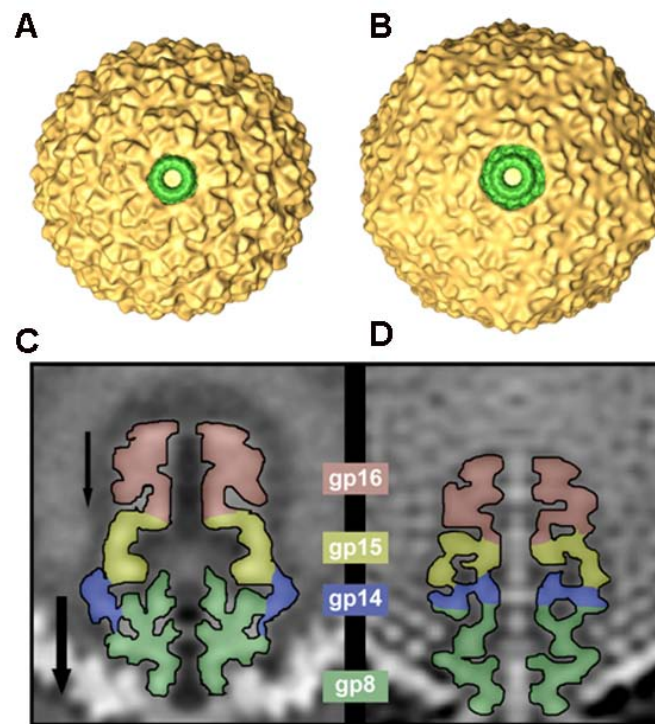


**Figura 1.18: Reconstrucción tridimensional de las partículas infectivas del fago T7.** **A)** Representación del virión reconstruido con simetría 5. **B)** Sección central de dicha reconstrucción. El ADN se encuentra organizado en capas concéntricas. Figura adaptada de (Agirrezabala et al, 2005a).

El virus reconstruido muestra una cola de 18,5 nm localizada en el mismo vértice que el complejo núcleo-conector. Además, el interior de la cápsida tiene una morfología compleja debido al núcleo y a la alta densidad de condensación del ADN. Este ADN está organizado en capas concéntricas al exterior y una zona interna menos densa.

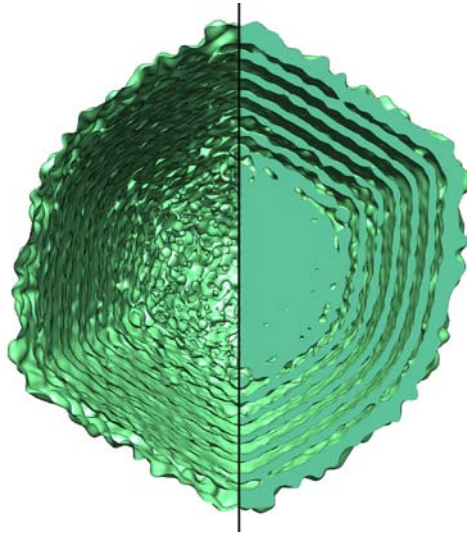
La resolución de unos 1,9 nm que se alcanzó en la reconstrucción anteriormente descrita (Agirrezabala et al, 2005a), no permitió distinguir las transiciones en la estructura secundaria que tienen lugar durante la maduración de la cápsida. Sin embargo, se definieron los cambios

conformacionales en cuanto al tamaño de la cápsida (de los 51nm que tiene la precabeza a los 60 nm para la cabeza madura), a su forma (de una forma casi esférica a una poliédrica), al grosor de la pared (de 5 nm en el caso de la precabeza a 2 -2,5 nm en el caso del virión) o a los cambios en estructura de los capsómeros. Durante la maduración, la proteína de andamiaje se desensambla y la precabeza se expande irreversiblemente para generar una cabeza más grande (Figura 1.19A y B), y el núcleo se mueve a lo largo del eje 5 de la partícula y se inserta en la cápsida permitiendo su interacción con componentes de la cola (Agirrezabala et al, 2005a). Además, el dominio central del núcleo también sufre una transformación que se ha relacionado con el empaquetamiento del ADN (Figura 1.19C y D).



**Figura 1.19: Maduración del núcleo y de la cápsida del bacteriófago T7. A)** Precabeza reconstruida y mostrada a lo largo del eje 5, permitiendo visualizar en verde el conector. **B)** Cabeza madura reconstruida y mostrada a lo largo del eje 5, permitiendo visualizar en verde el conector. **C)** y **D)** Reordenación del complejo núcleo durante la transición precabeza-cabeza madura, respectivamente. Figura adaptada de (Agirrezabala et al, 2005a).

Con el fin de conseguir una reconstrucción de la cabeza madura de alta resolución, se hizo una nueva reconstrucción imponiendo simetría icosaédrica (Figura 1.20 – datos no publicados) donde se observan las capas de ADN y sus conexiones con la cápsida de la cabeza madura.



**Figura 1.20: Corte del mapa de la cabeza reconstruida con simetría icosaédrica.**

La resolución de este mapa, junto con la presencia del ADN en el interior de la cápsida, impide la segmentación de la cara interna de la cápsida y la extracción de la densidad correspondiente a la unidad estructural de la cápsida madura. Esto impide conocer las bases moleculares del proceso de maduración del bacteriófago T7.

En base a estos antecedentes, esta tesis doctoral se centra en desarrollar un protocolo para vaciar de ADN las partículas virales maduras del bacteriófago T7 y obtener la estructura de la cápsida madura a una resolución suficiente para establecer las reorganizaciones moleculares involucradas en el proceso de maduración de la cápsida del virus.



## **2 Objetivos**



La publicación de la reconstrucción tridimensional de la precabeza de T7 a resolución subnanométrica (Agirrezabala et al, 2007) dejó abierta la posibilidad de estudiar los cambios estructurales a nivel molecular que experimenta el bacteriófago T7 durante la transición precabeza-cabeza madura. Por ello, los Objetivos que nos propusimos al comienzo de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Reconstrucción a resolución subnanométrica de la cápsida madura del fago T7 usando criomicroscopía electrónica y procesamiento digital de imagen.
2. Generación de un modelo pseudoatómico para la cápsida madura.
3. Definir los cambios implicados en la maduración de la cápsida.
  - 3a) Reorganización de dominios en la proteína de la cápsida.
  - 3b) Identificación y comparación de las zonas de contactos intra- e inter- capsoméricos para la precabeza y la cabeza madura.
4. Análisis de la estabilidad global de las precabezas y las cabezas maduras del bacteriófago T7.



### **3 Materiales y Métodos**



## 3.1 Material Biológico

### 3.1.1 Virus

El bacteriófago T7 silvestre empleado proviene de la colección ATCC (“American Type Culture Collection”, código BAA-1025-B2). El mutante del fago T7 (T7 5-am) utilizado para la producción de precabezas contiene una mutación sensible a supresor en el gen de la polimerasa viral (gp5) (Nakasu et al, 1985) y fue proporcionado por F.W. Studier, del laboratorio Brookhaven National Laboratory, Biology Department, Upton, NY 11973, USA.

### 3.1.2 Cepas bacterianas

La cepa permisiva de *E. coli* R11S (su<sup>+</sup>) se utilizó para la amplificación del mutante T7 5-am. Tanto en la amplificación y producción del fago silvestre, como en la producción de precabezas a partir del mutante, se utilizó la cepa restrictiva de *E. coli* BL21 (su<sup>-</sup>).

## 3.2 Amplificación y purificación del bacteriófago T7

Para la obtención de títulos elevados de fago se empleó un protocolo de amplificación en medio líquido. Para ello se infectó un cultivo de la cepa BL21 de *E. coli* en fase exponencial de crecimiento con el fago silvestre a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. Se incubó a 37°C con agitación hasta que la DO<sub>600nm</sub> decayó hasta 0.2. Las células no lisadas y los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación en un rotor GS3 (*Sorvall*) a 8000 rpm, durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se sedimentó durante 16 horas en un rotor GS3, a 8000 rpm y a 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en un volumen mínimo de tampón TMS (50 mM Tris-HCl pH 7,8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1M NaCl) y se cargó en un gradiente discontinuo de cloruro de cesio formado por tres soluciones de densidades 1,45; 1,5 y 1,7 g/cm<sup>3</sup>. El gradiente se ultracentrifugó en un rotor SW28 (*Beckman-Coulter Inc.*), durante 4 horas a 22000 rpm y 4°C. La banda correspondiente al fago se extrajo mediante punción lateral y se dializó frente a TMS durante 16 horas.

## 3.3 Amplificación del fago mutante T7 5-am

Para reducir la tasa de mutaciones en la amplificación del fago mutante se utilizó un protocolo en medio sólido. Para ello se infectó la cepa permisiva *E.coli* R11S en condiciones de lisis confluyente con el fago mutante y se sembró sobre una base de TopAgar (Sambrook et al,

1989). Tras una incubación durante la noche a 37°C, se añadió 5 ml de TMS sobre cada placa para resuspender los fagos, y se dejó con agitación a 4°C durante 6 horas. Posteriormente se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación en un rotor GS3, a 8000 rpm y 4°C. El sobrenadante se ultracentrifugó en un rotor 50.2 Ti (*Beckman-Coulter Inc.*), durante 2 horas a 42000 rpm y 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en un volumen mínimo de TMS y se tituló por el procedimiento habitual.

### 3.4 Titulación de los stocks de fagos

La titulación de los stocks de fagos se realizó mediante el procedimiento habitual, descrito por Adams en 1950 (Adams, 1950). Este protocolo consiste en sembrar diluciones seriadas de la preparación de virus junto con bacterias en fase de crecimiento ( $DO_{600nm} = 0,8$ ) sobre una base de TopAgar. Tras una incubación durante la noche a 37°C se contabilizaron las placas de lisis y se calculó el título correspondiente a cada preparación.

### 3.5 Producción y purificación de precabezas de T7

Con el objetivo de llevar a cabo la producción de precabezas, se infectó un cultivo de la cepa BL21 de *E.coli* en fase exponencial de crecimiento con el fago mutante a una MOI de 10. Se incubó a 37°C en un agitador durante 40 min, comprobando que la densidad óptica no había disminuido significativamente. El cultivo se centrifugó en un rotor GSA (*Sorvall*), durante 15 min a 7000rpm y 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de TMS. Las células se lisaron mediante tratamiento con lisozima a una concentración final de 200µg/ml durante 20 min a 4°C. Posteriormente se solubilizaron las membranas añadiendo Tritón X-100 a una concentración final de 10%. Finalmente se trató la muestra con NaCl 5M y se cargó en un colchón de sacarosa al 20% en TMS, que se ultracentrifugó en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*) durante 3h 30min a 37000 rpm y 4°C. El sedimento del colchón se resuspendió en el mínimo volumen de TMS y se cargó sobre un gradiente lineal de sacarosa del 10 al 40%, que se centrifugó en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*) durante 1h a 37000 rpm y 4°C. El gradiente se separó en 16 fracciones que se caracterizaron bioquímicamente mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Las fracciones que contenían las precabezas se dializaron frente a TMS, y se cargaron en un gradiente isopícnico de cloruro de cesio de densidad inicial media de 1,28 g/cm<sup>3</sup>, que se ultracentrifugó en un rotor NVT65 (*Beckman-Coulter Inc.*) durante 16 h a 37000 rpm y 4°C.



### 3.6 Obtención del bacteriófago T7 vacío de ADN

El virus silvestre purificado se incubó a 37°C durante 16 horas con 1M perclorato sódico (NaClO<sub>4</sub>). Posteriormente se añadió DNaseI a una concentración de 10µg/ml y se dejó 1 hora a temperatura ambiente. La muestra se ultracentrifugó en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*), 6 horas a 37000 rpm y 4°C. El sedimento resultante se resuspendió en 150µl TMS y se cargó en un gradiente lineal de sacarosa del 10 al 40%. El gradiente se centrifugó en un rotor SW55 Ti (*Beckman-Coulter Inc.*) durante 1 hora y 45 min a 35000 rpm y 4°C y posteriormente se fraccionó en 16 alícuotas que fueron caracterizadas bioquímicamente y mediante microscopía electrónica.

### 3.7 Gel de agarosa en condiciones nativas

Los geles de agarosa en condiciones nativas representan una herramienta muy útil para analizar complejos macromoleculares y se siguió un protocolo descrito en (Duda et al, 1995a). Se usó el mismo sistema que normalmente se usa para la electroforesis de las muestras de ADN. Se preparó un gel de agarosa a 0,8% en tampón TAMg (40mM Tris base, 20mM ácido acético (pH 8.1) y 1mM sulfato de magnesio). El tampón TAMg es similar al tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) usado para las electroforesis de ADN, excepto que el agente quelante EDTA es sustituido por sulfato de magnesio. Las muestras se prepararon para la electroforesis con tampón de carga (50% (v/v) Glicerol, 0,2 M Tris-HCl y 4 mg/ml azul de bromofenol) en relación 3:1. Después de la electroforesis el gel se sumergió en un baño con tampón de fijación (25% (v/v) isopropanol y 10% (v/v) ácido acético) durante 20 minutos. Luego el gel se seco entre papeles de filtro hasta obtener una película fina y posteriormente se tiñó con solución de Coomassie (1mM Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad); 48% v/v etanol, 25% v/v ácido acético glacial) durante 20 minutos.

### 3.8 Preparación de las muestras para microscopía electrónica

#### 3.8.1 Tinción negativa

Las muestras se prepararon sobre rejillas de cobre-colodión sombreadas con carbono e ionizadas justo antes de añadir la muestra, para hacer hidrofílica su superficie. En este tipo de preparaciones la rejilla se depositó sobre una gota de 5µl de la muestra a estudiar, se incubó 3 min a temperatura ambiente y se lavó dos veces con agua para eliminar el exceso de muestra. El exceso de líquido se eliminó mediante el contacto del borde de la rejilla con papel de filtro grado

1 (*Whatman*). Las muestras se contrastaron por tinción negativa con una solución de acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 1 min y el exceso de agente de tinción se eliminó por contacto de la rejilla con papel de filtro. Para visualizar las rejillas se usó un microscopio JEOL 12000 EX II estabilizado a 100 kV.

### 3.8.2 Criomicroscopía electrónica

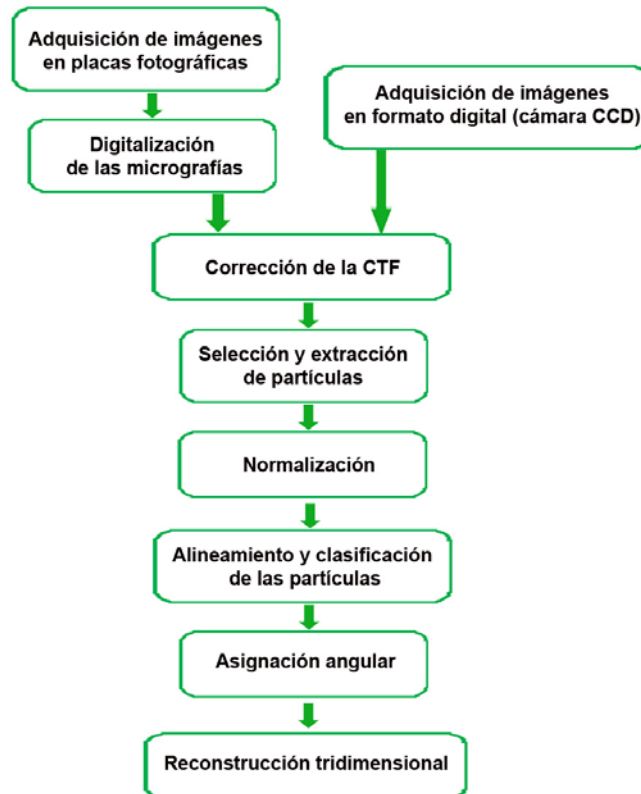
Para el análisis por criomicroscopía electrónica (crioME), 5  $\mu$ l de muestra se incubaron durante 1 min sobre rejillas de cobre-rodio recubiertas con una película de carbón microperforado (*Quantifoil* R2/2), y a las que previamente se le había sometido a una descarga iónica. Tras esta incubación se eliminó el exceso de muestra con papel Whatman grado 1, y la rejilla se sumergió a alta velocidad en etano líquido (-178°C) empleando el equipo de criopreparación Leica EM CPC. Esta congelación ultrarrápida permite que la muestra quede embebida en la capa de hielo vítreo conservando su estado nativo.

Para mantener la muestra a la temperatura del nitrógeno líquido y colocarla en el microscopio para su observación se empleó un criobrazo modelo GATAN 626.53P50. La recogida de datos se llevó a cabo en un microscopio Tecnai G<sup>2</sup> FEG 200 (FEI), equipado con anticontaminador de nitrógeno líquido y estabilizado a 200kV. Las imágenes se adquirieron sobre placas fotográficas Kodak SO-163 bajo condiciones de mínima dosis ( $<10\text{e}^-/\text{\AA}$ ) a una magnificación nominal de 50000x y en un rango de desenfoque de entre -0.5 y -3  $\mu\text{m}$ . La técnica de mínima dosis se basa en irradiar lo menos posible la zona donde se va a adquirir la foto ( $<10\text{e}^-/\text{\AA}$ ), de tal forma que el enfoque y las correcciones de las aberraciones de las lentes del microscopio se realizan en áreas adyacentes a la de interés y la zona de la foto se irradia solamente en el momento de registrar la imagen.

## 3.9 Procesamiento digital de imágenes y reconstrucción tridimensional de partículas individuales

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión son las proyecciones bidimensionales de los objetos tridimensionales observados. La información de la tercera dimensión se puede recuperar a partir de la información contenida en las diferentes proyecciones del objeto, siempre que se conozcan los ángulos que las relacionan espacialmente y que cubran uniformemente todo el espacio.

Un esquema del procesamiento de las imágenes se muestra en la [Figura 3.1](#).

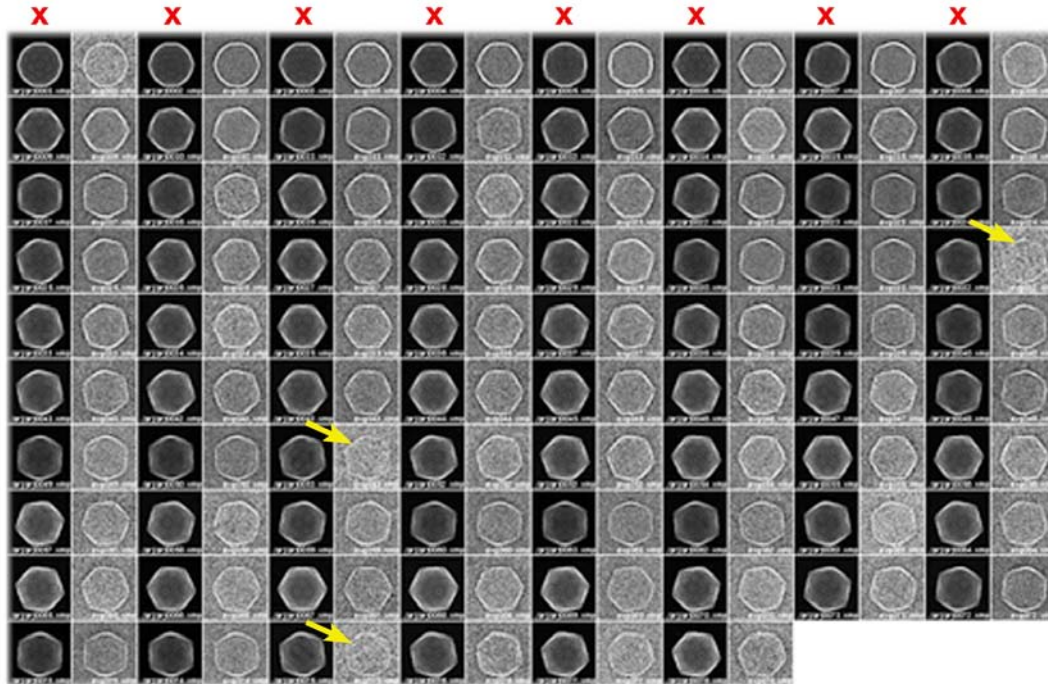


**Figura 3.1: Diagrama de flujo del protocolo seguido para el procesamiento digital de las imágenes de microscopía electrónica.**

Las micrografías se digitalizaron en un escáner Photoscan TD (Zeiss) con un intervalo de muestreo de  $7\text{ }\mu\text{m}/\text{píxel}$ , que se corresponde a  $0,14\text{ nm}/\text{píxel}$  sobre el espécimen. La calidad de cada imagen, en cuanto a su astigmatismo y deriva, se evaluó mediante el análisis de su transformada de Fourier. Usando el programa *bshow* del paquete de programas Bsoft (Heymann & Belnap, 2007), se calculó el desenfoque real de cada micrografía y se hizo una clasificación manual inicial de las micrografías en función de dicho desenfoque. Se seleccionaron sólo aquellas que alcanzaban un mínimo de  $10\text{ Å}$  de resolución. Sobre estas últimas se llevó a cabo la determinación y corrección de la función de transferencia de contraste (CTF) con el programa *ctffind3* (Mindell & Grigorieff, 2003) y el programa *bctf* del paquete Bsoft respectivamente. La selección de partículas se hizo manualmente con las herramientas del paquete Xmipp (Sorzano et al, 2004). Para el procesamiento de las partículas así obtenidas se utilizaron técnicas de alineamiento multirreferencia en espacio real y de reconstrucción tridimensional por retroproyección implementadas en los paquetes informáticos Spider (Frank et al, 1996) y Xmipp (Scheres et al, 2008) con imposición de simetría icosaédrica.

El proceso de reconstrucción tridimensional se realizó a través de lo que se conoce como refinamiento angular iterativo. Este proceso comienza con la proyección de un volumen de referencia (modelo inicial) teniendo como resultado un conjunto de imágenes bidimensionales llamadas proyecciones teóricas. Las partículas seleccionadas de las micrografías se comparan

con las proyecciones teóricas y se le asignan a cada una los ángulos correspondientes de aquella proyección con la que guardan una mayor semejanza, obteniéndose así las orientaciones de las proyecciones experimentales. A cada proyección teórica le corresponde un número variable de proyecciones experimentales que serán promediadas, esto genera un grupo de imágenes medias experimentales que tiene una correspondencia directa con las proyecciones teóricas. La finalidad del promediado es mejorar la relación señal/ruido ya que en criomicroscopía electrónica las imágenes individuales tienen mucho ruido; el número de imágenes que componen cada clase influye en la relación señal-ruido del promedio obtenido (Figura 3.2).



**Figura 3.2: Comparación entre las proyecciones teóricas de un volumen y los promedios de imágenes experimentales obtenidos tras el alineamiento.** En las columnas marcadas con X se muestran las proyecciones teóricas obtenidas a partir de la proyección computacional del volumen de referencia. Las columnas sin marca corresponden a las imágenes promedio de las imágenes experimentales asignadas. Las flechas amarillas señalan proyecciones con pocas partículas.

En las imágenes procesadas en nuestro caso se observó que habría algunas proyecciones que tenían un menor número de imágenes (marcadas con flechas amarillas), lo que se traduce en una menor relación señal-ruido.

De este modo, tras la clasificación bidimensional se obtiene una media de partículas asignadas a cada proyección teórica del volumen inicial. Finalmente se procede a la retroproyección de esas medias, utilizando para ello el valor del ángulo de proyección asignado a ésta, y de esta forma se obtiene un nuevo modelo tridimensional procedente de los datos experimentales. El modelo así obtenido en cada ciclo de refinamiento angular se filtra y se utiliza como volumen de referencia para un siguiente ciclo. Este proceso iterativo finaliza cuando las diferencias entre los volúmenes que se obtienen de dos ciclos sucesivos son mínimas y las proyecciones de estos volúmenes son muy similares (Frank, 2006).

Cada ciclo de proyección, comparación, asignación angular y retroproyección constituye una iteración y para la reconstrucción de un volumen hacen falta, en general, un gran número de iteraciones. Además, si el espécimen tiene gran tamaño, como es el caso de los virus, se requiere una capacidad de cálculo computacional muy elevada. Para las reconstrucciones presentadas en esta tesis doctoral se han utilizado principalmente los recursos de la unidad central de proceso de datos del Centro Nacional de Biotecnología.

Como modelo inicial del procesamiento se emplearon datos previos obtenidos en el laboratorio por Xabier Agirrezabala obtenidos mediante la reconstrucción con simetría icosaédrica del virus T7 maduro con ADN (datos no publicados). Después de unos ciclos de refinamiento se observó que la presencia del ADN no permitía la correcta evolución del proceso de reconstrucción, de forma que se le aplicó una máscara para poder eliminar la masa correspondiente al ADN. Este nuevo volumen fue después utilizado como modelo inicial en el procesamiento de las partículas de T7 maduras y vacías de ADN.

Una vez concluido el proceso de refinamiento angular iterativo se llevó a cabo la estimación de la resolución del mapa obtenido. Esto significa definir de manera cuantitativa el grado de detalle que se aprecia en la estructura resuelta. Para ello se calculó la función FSC (*Fourier Shell Correlation*) (van Heel & Schatz, 2005) entre dos mapas independientes que contenían cada uno la mitad de las partículas totales empleadas en la reconstrucción final. La resolución de cada reconstrucción fue determinada como el recíproco de la frecuencia espacial donde el coeficiente de correlación es 0,5 (criterio FSC = 0,5) o 0,3 (criterio FSC = 0,3).

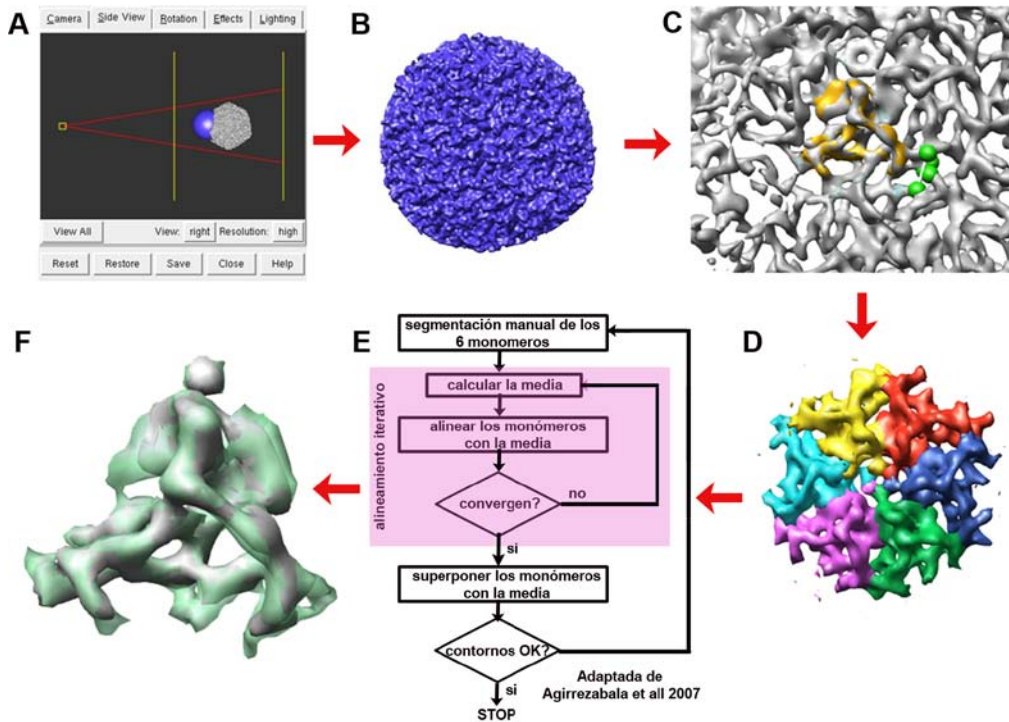
Finalmente se realizó una compensación de la atenuación de las amplitudes en las altas frecuencias mediante el programa EM-BFACTOR, que fue empleado para calcular y corregir el decaimiento de las amplitudes (Fernandez et al, 2008).

### 3.10 Segmentación de mapas tridimensionales

Una de las etapas más importantes para interpretar y entender un mapa es su segmentación. El proceso de segmentación consiste en delimitar un área de interés de un mapa tridimensional, extraer esa densidad y tratarla después como un volumen independiente (Chang et al, 2012). El mapa de densidad se segmentó manualmente usando herramientas como “*color zone*” del programa Chimera (Pettersen et al, 2004) y siguiendo el esquema de segmentación previamente publicada por (Luque et al, 2010).

Para definir los bordes de cada zona de interés se visualizó el mapa a distintos niveles de densidad, basándonos en la discontinuidad de la densidad entre vecinos. Para segmentar las siete subunidades que forman la unidad asimétrica del virus T7 se comenzó con una zona aproximada (delimitada por la esfera azul en la [Figura 3.3A](#)). Con la ayuda de unos marcadores esféricos, se delimitaron los márgenes de cada una de las subunidades, refinando iterativamente cada volumen extraído para evitar solapamientos entre subunidades o pérdidas de densidad, y se guardaron como volúmenes individuales ([Figura 3.3C](#)). Una vez obtenidas las subunidades

del hexámero se usó un algoritmo iterativo para refinar y mejorar nuestra segmentación manual (Figura 3.3E). Este algoritmo iterativo de alineamiento y promediado de cada uno de los monómeros aislados se había usado previamente en el laboratorio para la segmentación de las subunidades de la precabeza (Agirrezabala et al, 2007). Conforme a este algoritmo, cada monómero se alineó con la media (aplicando rotaciones y translaciones) para maximizar el coeficiente de correlación con la media. La contribución de cada monómero se eliminó de la media antes de calcular el coeficiente de correlación. Al final de este proceso se obtiene un monómero promedio de los seis monómeros del hexón (Figura 3.3F).



**Figura 3.3: Esquema general del proceso de segmentación de los monómeros que forman la unidad asimétrica del virus T7.** **A)** Ventana de *Chimera* visualizando del volumen del virus T7 reconstruido. Con la esfera azul se marca la zona aproximada que se seleccionó. **B)** La zona aproximada seleccionada marcada con “color zone”. **C)** Usando los marcadores verdes restringimos la zona de segmentación a un monómero (en amarillo). **D)** Los volúmenes aproximados de los seis monómeros segmentados. **E)** Esquema del algoritmo iterativo empleado para refinar y mejorar la segmentación de los monómeros. **F)** Superposición del volumen promedio de los monómeros (en gris) y de uno de los monómeros (en verde transparente).

### 3.11 Detección de elementos de estructura secundaria

En el análisis automático de la posible presencia y localización de elementos de estructura secundaria en mapas de densidad se utilizó el programa AIRS (<http://ncmi.bcm.tmc.edu/software/AIRS>, (Baker et al, 2007), que proporciona una interfaz gráfica para *SSE Hunter* y *SSE Bilder* en el programa Chimera. Este programa analiza sistemáticamente el mapa de densidades mediante tres criterios independientes: I) la



generación de una estructura de pseudoátomos en la que se evalúa la posición y la distancia de cada pseudoátomo respecto a los situados en su entorno; II) un algoritmo que define un esqueleto que representa la forma y topología específica del mapa y III) la correlación de una hélice  $\alpha$  prototipo con el mapa de densidad. Como resultado de estas valoraciones se genera un modelo de elementos de estructura secundaria para un determinado mapa de densidades.

### 3.12 Generación del modelo atómico de gp10 para la cabeza y precabeza

El modelo atómico de la proteína gp10A y su correspondiente encaje en el mapa de la media del monómero, fueron llevados a cabo en colaboración con el Dr. Javier A. Velázquez-Muriel, del Departamento “Bioengineering and Therapeutic Science” de la Universidad de California, San Francisco.

El modelo atómico del monómero gp10A de la cápsida madura del fago T7, se generó alineando la secuencias de gp10A con la secuencia de la proteína gp5, que es la proteína de la cápsida de HK97 (PDB ID 1ohg). La secuencia de aminoácidos Leu<sup>100</sup> - Glu<sup>345</sup> de gp10A se alineó con la secuencia Leu<sup>133</sup> - Pro<sup>373</sup> de gp5 con PSI-BLAST (Altschul et al, 1997). Los primeros 100 aminoácidos correspondientes al dominio amino terminal de la secuencia de gp10A se eliminaron debido a la baja identidad de secuencia en esta región con su homólogo en HK97. Dada la baja similitud entre las dos secuencias, se mejoró el alineamiento en Chimera teniendo en cuenta una predicción de elementos de estructura secundaria realizada con PSIPRED versión 2.6 (McGuffin et al, 2000) empleando un criterio de alineamiento de 20%. El alineamiento final obtenido conservaba la estructura secundaria y una identidad en la secuencia de 14%. Un modelo de características similares fue obtenido con MODELLER (Sali & Blundell, 1993) usando parámetros estándar. Finalmente el modelo generado se ajustó como cuerpo rígido en el mapa de densidad de criME con Chimera maximizando el coeficiente de correlación. Los residuos Leu126-Pro147 del lazo E de la proteína gp10A se quitaron del modelo porque su densidad correspondiente en el mapa de criME no pudo asignarse de forma no ambigua. El siguiente paso fue un ajuste flexible donde las hélices  $\alpha$  se ajustaron manualmente en sus áreas correspondientes del mapa de criME con Chimera. Dicho ajuste se refinó con el programa Flex-EM (Topf et al, 2008), manteniendo las hélices  $\alpha$  y las láminas  $\beta$  como cuerpos rígidos y se optimizó con la herramienta de gradientes conjugados del programa (la opción CG). El modelo resultante de todo este proceso se usó en un segundo paso de refinamiento con Flex-EM, refinando cada átomo independientemente del resto con la opción “optimización mediante dinámica molecular” del programa. Tan solo un 2% de los residuos del modelo obtenido se desviaban de las posiciones permitidas en el diagrama de Ramachandran. Siete copias de este último modelo se ajustaron como cuerpos rígidos en el mapa de densidad de criME de la unidad asimétrica entera. A continuación se añadieron al modelo final los residuos del lazo E previamente eliminados y se permitió cierto grado de relajación de los átomos pertenecientes a

dicho lazo en el mapa de crioME mediante la opción “dinámica molecular” del programa Flex-EM.

Como último paso se generó un modelo para toda la cápsida del virus T7 maduro aplicando simetría icosaédrica al modelo de la unidad asimétrica y refinando las posiciones de las moléculas con el programa URO (Navaza et al, 2002), ya que de esta forma se permite conservar la simetría icosaédrica durante el refinamiento.

Se generó también un nuevo modelo atómico para la proteína de la cápsida gp10A de la precabeza en base a la estructura atómica de la proteína gp5 de la precabeza (forma II) de HK97 (PDB ID 3E8K). Esto se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos anteriormente en la generación del modelo atómico de la proteína de la cabeza madura. Se observó que el nuevo modelo obtenido era prácticamente idéntico al publicado anteriormente (Agirrezabala et al, 2007) con mínimas reasignaciones de algunos residuos en la estructura secundaria.

La geometría de los modelos previamente obtenidos fue idealizada con el programa REFMAC5 (Murshudov et al, 1999) y las coordenadas generales de los modelos fueron validadas mediante el servidor de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB), (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ* <http://validate.rcsb.org/>).

### 3.13 Análisis estructural

El cálculo de potencial electrostático superficial se hizo con la opción de *Chimera* “Coulombic Surface Coloring”, que permite calcular y colorear la superficie cargada del mapa.

Para definir el área de interacción entre proteínas se empleó la herramienta en red PISA ([http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/cgi-bin/piserver](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver)) (Krissinel & Henrick, 2007). La superficie de interacción se define como la mitad de la diferencia entre el área total accesible entre monómeros aislados y monómeros ensamblados. Se consideró que dos residuos estaban implicados en la interacción cuando algunos de sus átomos se encuentran dentro de los 0,4 nm de proximidad entre sí. El cálculo de distancias se llevó a cabo empleando el programa CCP4i (Potterton et al, 2003). Este criterio de asignación se verificó empleando el programa Chimera, con el que se obtuvieron resultados similares.

El programa utilizado para la visualización y representación de los mapas de microscopía, así como de las estructuras atómicas, ha sido Chimera.



### 3.14 Números de acceso de los modelos atómicos y de la estructura de criomicroscopía electrónica

Las coordenadas atómicas de los modelos generados en este trabajo han sido depositados en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB), (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ* <http://www.rcsb.org/>) con los números de acceso 3IZG para el modelo de la proteína mayoritaria de la precabeza y 2XVR para el modelo de la cabeza.

El mapa de densidad calculado para la cabeza del bacteriófago T7 ha sido depositado en la base de datos de estructura macromolecular *Electron Microscopy Data Bank* (EMDB) (<http://www.emdatabank.org>), con el número de acceso EMD-1810.



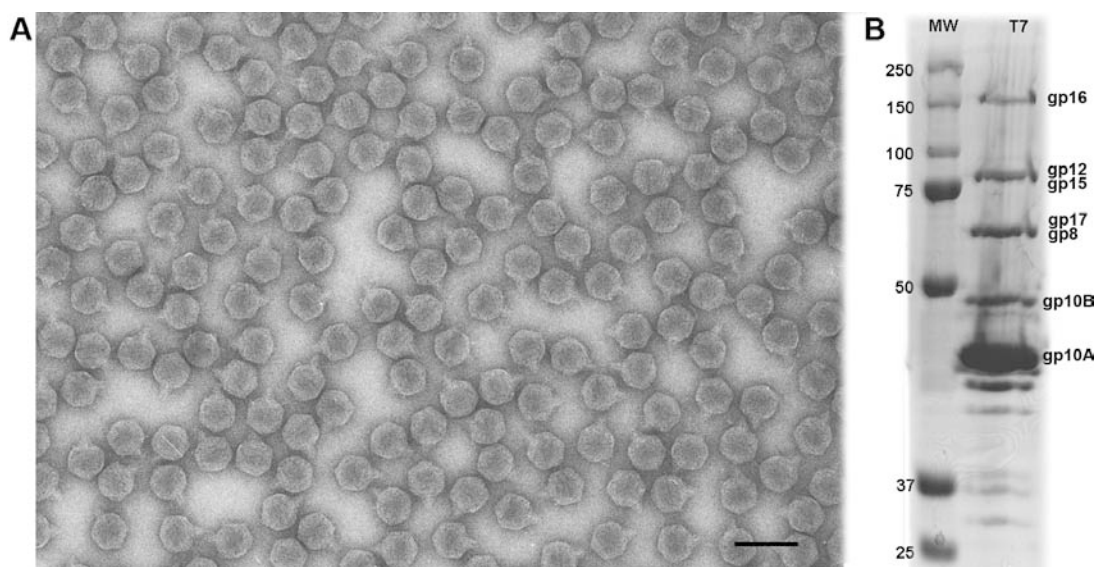
## **4 Resultados**



## 4.1 Producción y purificación del bacteriófago T7 maduro

Como primer paso en este trabajo, se llevó a cabo la producción del bacteriófago T7 infectivo. Anteriormente en el laboratorio se usaba un protocolo de amplificación en medio sólido que no tenía un rendimiento muy elevado así que para este trabajo se empleó un protocolo de amplificación en medio líquido (ver Materiales y Métodos). La purificación de los virus previamente amplificados se realizó en dos pasos. Un primer gradiente lineal de sacarosa seguido de un segundo gradiente discontinuo de cloruro de cesio. En este último gradiente se detecta una única banda en la interfase entre las densidades 1,50 y 1,70 g/cm<sup>3</sup>, acorde con la densidad de flotación de la partícula llena 1,51g/ml (Serwer, 1976).

Una vez obtenidas las partículas infectivas de T7 purificadas, comprobamos su composición mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, y su aspecto mediante microscopía electrónica de muestras negativamente teñidas (Figura 4.1). Estos análisis mostraron que la muestra era homogénea y de gran pureza.



**Figura 4.1: Análisis de las partículas infectivas purificadas de T7. A)** Campo de partículas con diferentes vistas en tinción negativa; **B)** Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. A la izquierda del gel se han representado los tamaños correspondientes a cada banda de los marcadores de peso molecular (MW) expresados en kDa. En el carril derecho se muestran las proteínas estructurales del virus infectivo T7 con sus correspondientes nombres. La barra de escala corresponde a 100 nm.

La composición de proteínas observada es la misma a la previamente descrita por Steven y Trus (Steven & Trus, 1986) conteniendo las proteínas de la cápsida gp10A (36,41 KDa) y gp10B (41,8 KDa), el conector gp8 (58,98 KDa), las proteínas internas del núcleo gp14 (20,83 KDa), gp15 (84,21 KDa) y gp16 (143,84 KDa), las proteínas de la cola gp11 (22,28 KDa) y gp12 (89,26 KDa) y la proteína gp17 (61,44 KDa) responsable de la formación de las fibras. El alto rendimiento y la pureza de la muestra así obtenida, así como su calidad, supondrían un buen material de partida para los futuros ensayos.

## 4.2 Obtención y análisis de partículas maduras vacías de ADN mediante tratamiento químico

### 4.2.1 Ensayos para liberar el ADN del virus

La liberación del ADN de los virus bacterianos se puede llevar a cabo en condiciones *in vitro* mediante la incubación con el receptor bacteriano purificado, así como mediante diferentes métodos químicos capaces de activar *in vitro* el proceso de liberación del ADN: tratamiento con perclorato sódico ( $\text{NaClO}_4$ ) (Freifelder, 1966); (Tao et al, 1998), tratamiento con urea y EDTA (Tang et al, 2005), choque osmótico (Liu et al, 2005), choque térmico y 2 mM EDTA (Serwer, 1976), etc. A diferencia de otros virus, en el caso de T7 no se conoce con exactitud cuál es su receptor celular, aunque se ha descrito que los lipopolisacáridos (LPS) podrían ser los responsables de la interacción del virus T7 con la célula (Weidel, 1958); (Qimron et al, 2006). En todo caso, cada uno de estos métodos puede afectar de diferente manera la integridad estructural del virus de forma que se hizo necesario encontrar el método que mantenía la cápsida de T7 intacta tras el vaciado del ADN.

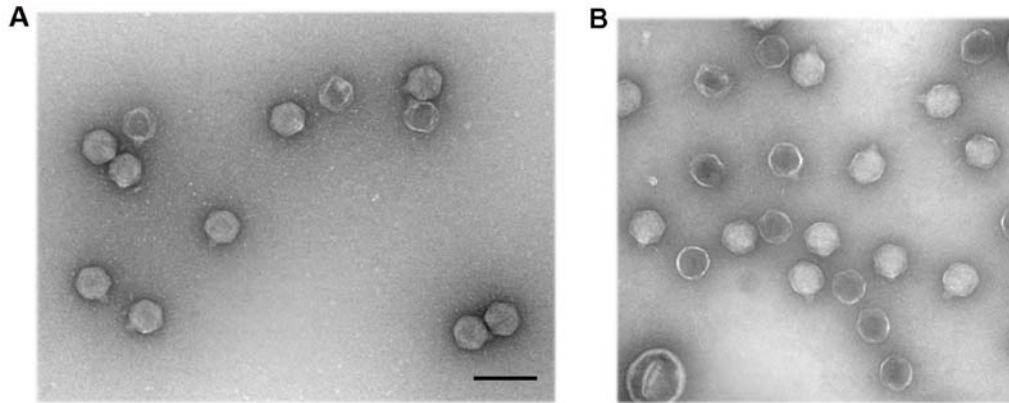
Previamente, como control, los virus maduros fueron sometidos a un tratamiento térmico a 37 y 60°C. Recogimos datos hasta 24 horas post tratamiento y observamos que en todos los casos el virus mantenía su integridad estructural mediante observación con microscopia electrónica y su actividad funcional (mediante ensayos de infectividad). Concluimos que en el caso del bacteriófago T7 el tratamiento térmico no induce por sí solo cambios en la estructura del virus.

Debido a que el método del tratamiento térmico no era efectivo y para encontrar el método óptimo de vaciado de las partículas virales de T7, se realizó un conjunto de ensayos utilizando diferentes agentes químicos a distintas concentraciones y tiempos. Recogimos muestras hasta 24 horas post tratamientos. Los datos más significativos están resumidos en la [Tabla 4.1](#).

Agente	Temperatura	Tiempo	Porcentaje vacíos
3M Urea	37 °C	1 hora	40%
3M Urea	60 °C	1 hora	80%
4M Urea	37 °C	1 hora	60%
2M Urea + 0,1M EDTA	37 °C	1 hora	30%
2M Urea + 0,1M EDTA	60 °C	1 hora	100%
1M $\text{NaClO}_4$	37 °C	1 hora	50%
1M $\text{NaClO}_4$	37 °C	16 horas	100%
Lipopolisacáridos O111:B4 ± $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$	37 °C	Hasta 24 horas	0%
Lipopolisacáridos O55:B5 ± $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$	37 °C	Hasta 24 horas	0%
Acido sialico (N-Acetylneuroamini)	37 °C	Hasta 24 horas	0%
$\text{NiCl}_2$	RT	Hasta 24 horas	0%

**Tabla 4.1: Resumen de los distintos tratamientos para vaciar de ADN el bacteriófago T7.**

Para ejemplificar el efecto de los tratamientos ensayados, mostramos en la [Figura 4.2](#), imágenes características de las pruebas de vaciado. Observamos como dependiendo del tratamiento aplicado se obtuvieron rendimientos más bajos o más altos en la expulsión del ADN de la cápsida madura.

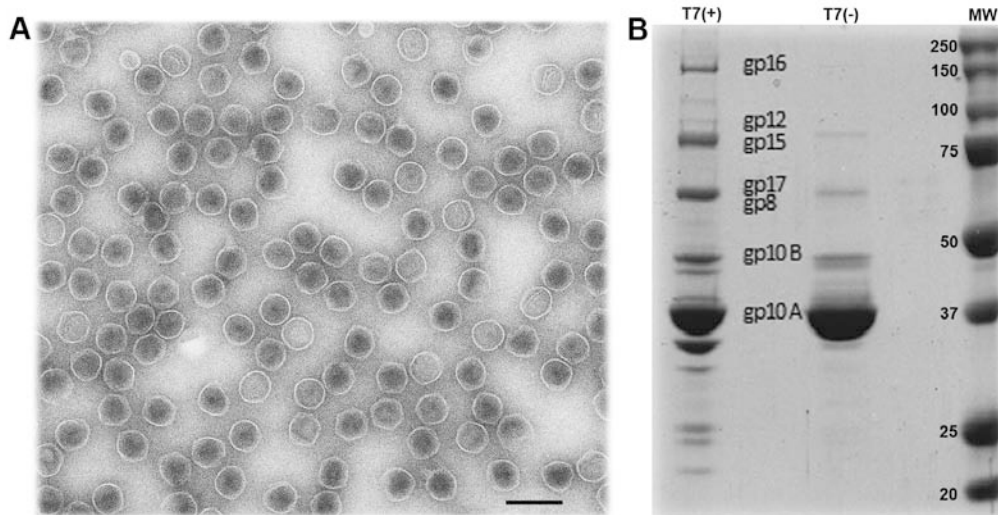


**Figura 4.2: Tratamientos químicos para vaciar los viriones T7 de ADN.** Campos representativos de micrografías de tinción negativa mostrando **A)** Tratamiento con 2M Urea y 0,1M EDTA a 37 °C durante una hora. **B)** Tratamiento con 1M NaClO<sub>4</sub> una hora a 37 °C. La barra de escala corresponde a 100 nm.

A la vista de estos resultados se decidió utilizar como método para vaciar las partículas virales de ADN, el tratamiento con 2M urea y 0,1M EDTA a 60 °C durante 50 minutos, ya que nos proporcionaban, un alto rendimiento de vaciado y siendo además grande el numero de virus que conservaban la cola. La preservación del bacteriófago entero, incluida la cola, podría permitir la obtención de la estructura completa del virus incluyendo aquellos elementos que no siguen de la simetría icosaédrica.

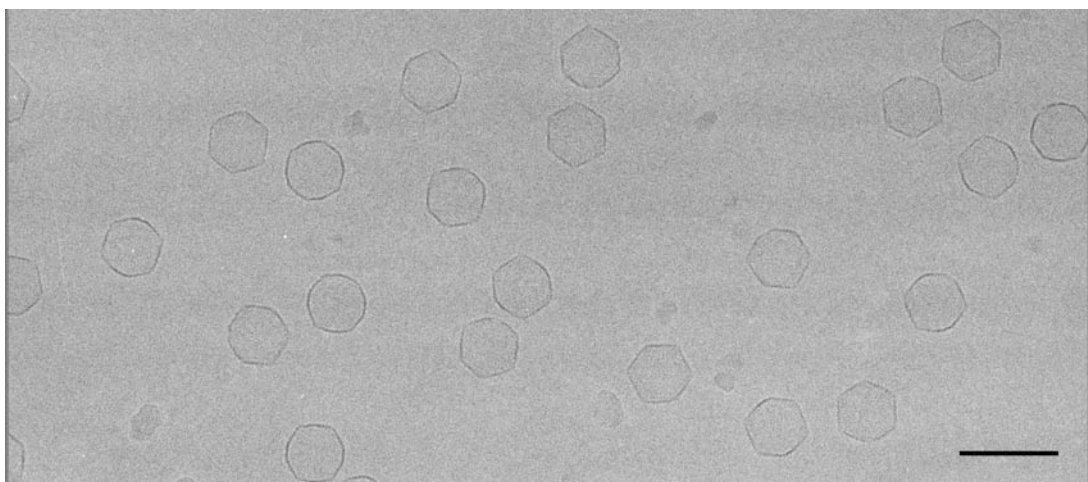
#### 4.2.2 Análisis de las partículas tratadas con 2M urea y 0,1M EDTA

El resultado de este tratamiento produjo, como se puede apreciar en la [Figura 4.3A](#), el virus T7 vacío de ADN y aparentemente con la estructura de la cápsida conservada. En los fagos llenos el alto empaquetamiento del ADN impide que el agente de tinción pueda penetrar en el interior de la cápsida. Por el contrario en los virus vacíos el acetato de uranilo difunde en el interior de la cápsida mostrando un interior oscuro y una forma ligeramente modificada debido probablemente al aplastamiento parcial de la cápsida (Carrasco et al, 2009). El ADN liberado en el medio durante el proceso de vaciado es degradado con DNasa I para evitar que interfiera con nuestros experimentos. Desde el punto de vista bioquímico, las partículas sometidas a este tratamiento pierden las proteínas del núcleo (gp14, gp15 y gp16) como se puede apreciar en la [Figura 4.3B](#) y, solo un porcentaje bajo, guardan las proteínas de la cola (gp11, gp12).



**Figura 4.3: Análisis de las partículas maduras sin ADN.** **A)** Campo de partículas en tinción negativa. La barra de escala corresponde a 100 nm. **B)** Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de las partículas con ADN, T7(+) y de las partículas vaciadas de ADN, T7(-). El carril de la derecha corresponde a los marcadores de peso molecular (MW) expresados en kDa.

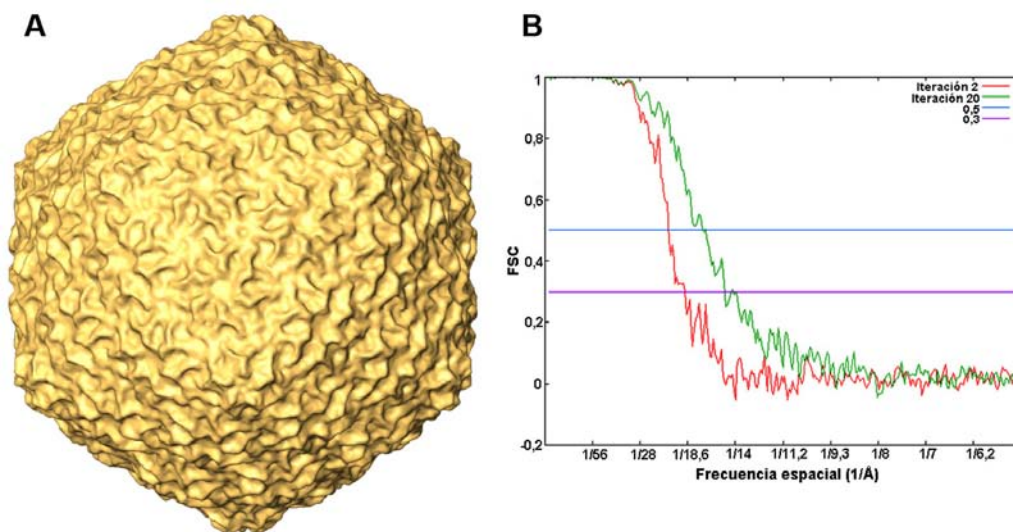
En base a estos análisis preliminares, se consideró que la integridad de la cápsida no ha sido afectada y por tanto, utilizamos esta muestra para hacer crio-microscopía electrónica con el objetivo de obtener una reconstrucción tridimensional de la cápsida del bacteriófago T7 maduro a alta resolución. La principal ventaja de la criomicroscopía electrónica frente a la microscopía electrónica convencional es la posibilidad de analizar macromoléculas en un estado nativo inmersas en una capa de hielo amorfo. Por este motivo la muestra fue vitrificada como se ha descrito en el capítulo Materiales y Métodos y se analizó en un microscopio Tecnai T-20 G<sup>2</sup> operado a 200 kV. La mayor coherencia del haz en este tipo de aparatos permite obtener información hasta frecuencias espaciales mucho mayores que en el caso de un microscopio con un emisor de electrones convencional; lo que es de suma importancia para nuestro objetivo de alcanzar una resolución subnanométrica.



**Figura 4.4: Campo de una micrografía de criome de partículas tratadas con 2M urea y 0,1M EDTA.** La barra de escala corresponde a 100 nm.



Se adquirieron unas 360 placas fotográficas. Dichas micrografías fueron digitalizadas y se seleccionaron sólo aquellas que alcanzaban un mínimo 10 Å de resolución. Para ello, se llevó a cabo una clasificación manual inicial de las micrografías empleando el programa *bshow* del paquete de programas Bsoft (Heymann & Belnap, 2007). Las micrografías seleccionadas se agruparon en 43 grupos de foco dependiendo del grado de desenfoque. Se seleccionaron manualmente con Xmipp (Sorzano et al, 2004) 5.072 partículas. Utilizamos herramientas del paquete Xmipp para generar un modelo inicial partiendo del virus maduro con ADN reconstruido anteriormente en el laboratorio (Agirrezabala et al, 2005a). Para el procesamiento de estas partículas utilizamos técnicas de alineamiento multirreferencia en espacio real y de reconstrucción tridimensional por retroproyección implementadas en el paquete informático SPIDER (Frank et al, 1996).



**Figura 4.5: Reconstrucción tridimensional de las partículas tratadas con urea y EDTA. A)** Vista desde el eje de simetría de orden 3. **B)** La curva FSC del volumen reconstruido en la segunda iteración de refinamiento (línea roja) y en la última iteración (línea verde). Las líneas azul y morada representan umbrales de FSC iguales a 0,5 y 0,3 respectivamente. Se estimó una resolución de 1,4 nm según el criterio de resolución FSC para un coeficiente de correlación de 0,3.

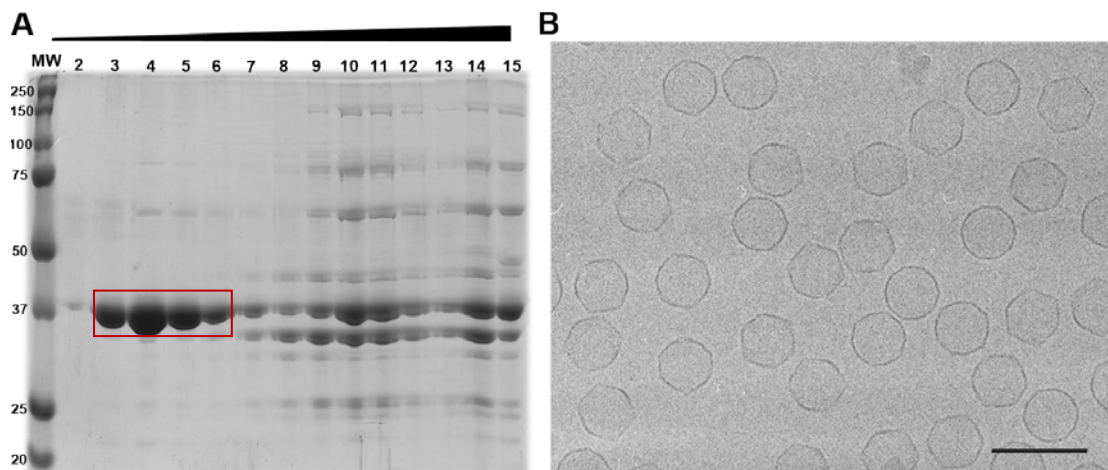
El refinamiento se realizó imponiendo simetría icosaédrica y tras 20 iteraciones de refinamiento obtuvimos un mapa cuya resolución final fue de 1,4 nm en base al criterio FSC 0,3 (van Heel & Schatz, 2005), como se aprecia en la [Figura 4.5B](#). Los detalles que muestra la cápsida reconstruida ([Figura 4.5A](#)) no son suficientes para delimitar los elementos constitutivos y realizar su segmentación.

Estos resultados nos hicieron considerar que no se podía alcanzar mayor resolución en esta reconstrucción porque el tratamiento químico habría afectado de alguna forma también la estructura de la cápsida por lo tanto se hacía imprescindible encontrar otro método para vaciar de ADN las partículas virales sin afectar la integridad de la cápsida.

#### 4.2.3 Análisis de las partículas tratadas con 1M NaClO<sub>4</sub>

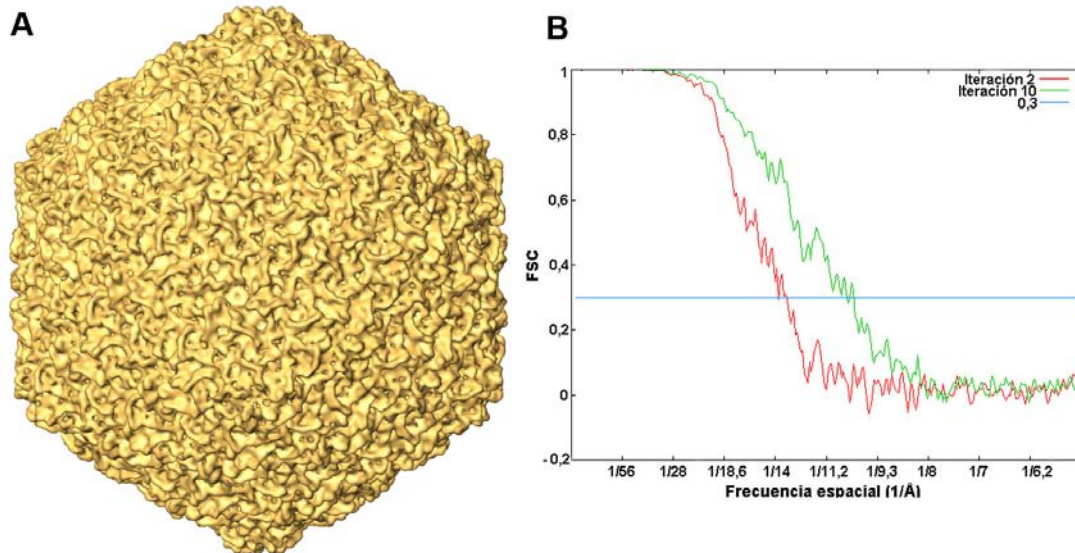
En la literatura hay trabajos previos que usan el NaClO<sub>4</sub> para vaciar de ADN los bacteriófagos. La eficacia del proceso depende de la concentración del perclorato y del virus y varía para distintos tipos de fagos. Estos trabajos sugieren que hay dos mecanismos de eyección: (1) a baja concentración de perclorato el ADN sería eyectado a través de la cola; (2) a mayores concentraciones, la cápsida se destruye parcialmente y el ADN se libera directamente en el medio. Se ha descrito, al menos para T7 y T4, que el comportamiento de estas partículas en presencia de NaClO<sub>4</sub> es heterogéneo (Freifelder, 1966); (Tao et al, 1998).

A pesar de que en los primeros ensayos, como se refleja en la [Tabla 4.1](#), las partículas tratadas con 1M de NaClO<sub>4</sub> a 37 °C durante 16 horas se vaciaban de ADN con un rendimiento de 100%, al escalar las cantidades y aumentar la concentración del virus la eficacia del tratamiento bajó casi a la mitad. A la vista del comportamiento heterogéneo del virus T7 decidimos que a pesar de la baja eficiencia, era importante tratar de preservar la integridad estructural del virus y, por tanto, usamos, 1M de NaClO<sub>4</sub> para vaciar de ADN las partículas infectivas de T7. Como se ha descrito en Materiales y Métodos, se sometió el virus maduro a un tratamiento con 1M de NaClO<sub>4</sub> a 37 °C durante 16 horas. Examinamos al microscopio electrónico la muestra así tratada y observamos que teníamos un 50% de fagos vacíos. Para eliminar los virus que conservaban el ADN se llevó a cabo una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa del 10 al 40%. Las cabezas vacías aparecen en las fracciones 3-6, como se observa en la [Figura 4.6A](#). Estas fracciones fueron dializadas y utilizadas para microscopia electrónica convencional y criomicroscopía electrónica ([Figura 4.6B](#)).



**Figura 4.6:** **A)** Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de las fracciones recogidas del gradiente de sacarosa en el que se cargaron las partículas infectivas tratadas con 1M NaClO<sub>4</sub>. El recuadro rojo indica la proteína mayoritaria de la cápsida, la gp10A, en las fracciones 3-6 que se usaron para la visualización por microscopia electrónica. **B)** Campo de una micrografía de criome, en el que se muestran partículas de la fracción 4. La barra de escala corresponde a 100 nm.

Para el procesamiento de estas partículas seguimos los mismos pasos descritos en el epígrafe anterior de partículas tratadas con urea y EDTA. A partir de las micrografías de criome fueron seleccionadas 5.217 partículas, con un rango de desenfoque entre  $-0,5$  y  $3 \mu\text{m}$  y las distribuimos manualmente en 25 grupos de foco. Usamos los programas de reconstrucción del paquete SPIDER y después de 10 iteraciones de refinamiento reconstruimos la cabeza madura sin ADN con una resolución estimada de  $1,07 \text{ nm}$  en base al criterio FSC  $0,3$  (Figura 4.7).



**Figura 4.7: Reconstrucción tridimensional de las partículas tratadas con  $\text{NaClO}_4$ .** **A)** Vista desde el eje de simetría de orden 3. **B)** La curva FSC del volumen reconstruido en la segunda iteración de refinamiento (línea roja) y de la última iteración (línea verde). La línea azul representa el umbral de FSC igual a  $0,3$ .

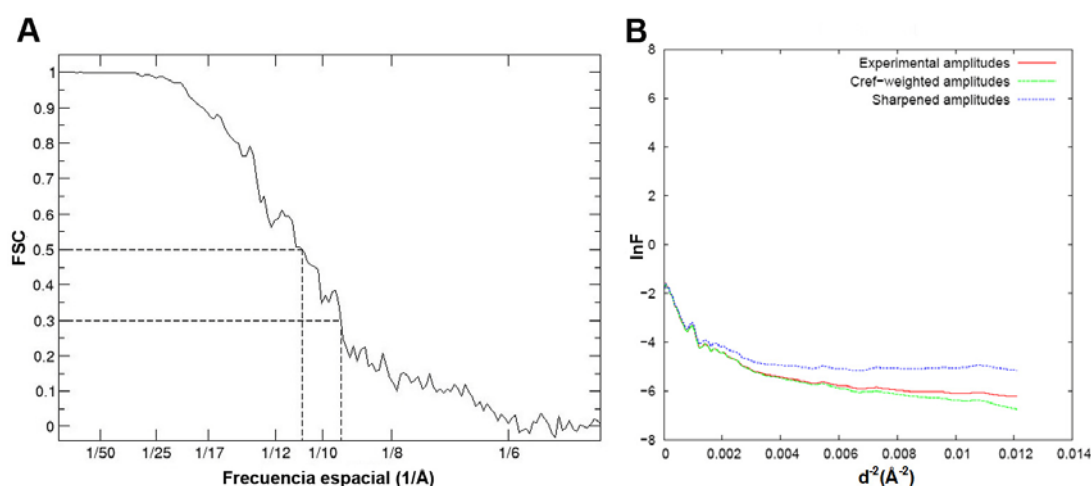
El mapa presenta una mejoría sustancial respecto al presentado en la Figura 4.5. Las partículas se procesaron con un factor de submuestreo de dos, ya que el gran tamaño ( $300 \times 300$ ) de las imágenes impide el uso del paquete SPIDER para las imágenes digitalizadas a  $7 \mu\text{m}$  si no se aplica submuestreo. Durante el procesamiento de estas partículas, se mejoró y consolidó el paquete informático Xmipp (Scheres et al, 2008) y decidimos trabajar con él, ya que permitía procesar nuestras partículas sin submuestreo. Por lo tanto, los datos que vamos a presentar a continuación provienen de la reconstrucción tridimensional de las partículas maduras sin ADN usando la interfaz de protocolos del paquete informático Xmipp.

## 4.3 Análisis estructural del virus maduro sin ADN

### 4.3.1 Características generales

Las 5.217 partículas provenientes del tratamiento con  $\text{NaClO}_4$  fueron procesadas con los protocolos de Xmipp. Las imágenes se agruparon automáticamente en 38 grupos de foco y se impuso simetría icosaédrica (i3). Después de 11 iteraciones de refinamiento de las imágenes sin submuestrear ( $1,4 \text{ \AA}/\text{pixel}$ ), obtuvimos un mapa cuya resolución estimada fue de  $1,08 \text{ nm}$  en base al criterio FSC  $0,5$  y de  $0,9 \text{ nm}$  para el criterio FSC  $0,3$ , como se muestra en la [Figura 4.8A](#).

El decaimiento de las amplitudes fue calculado y corregido con el programa EM-BFACTOR (Fernandez et al, 2008). Este programa modela el decaimiento con una función Gaussiana equivalente al factor de temperatura (o  $B$ -factor) comúnmente usado en cristalografía de rayos-X (Rosenthal & Henderson, 2003) y lo compensa aplicando la Gaussiana con el factor invertido. El factor de corrección,  $B$ -factor, encontrado por el programa fue de  $-5,29 \text{ nm}^2$  ([Figura 4.8B](#)).

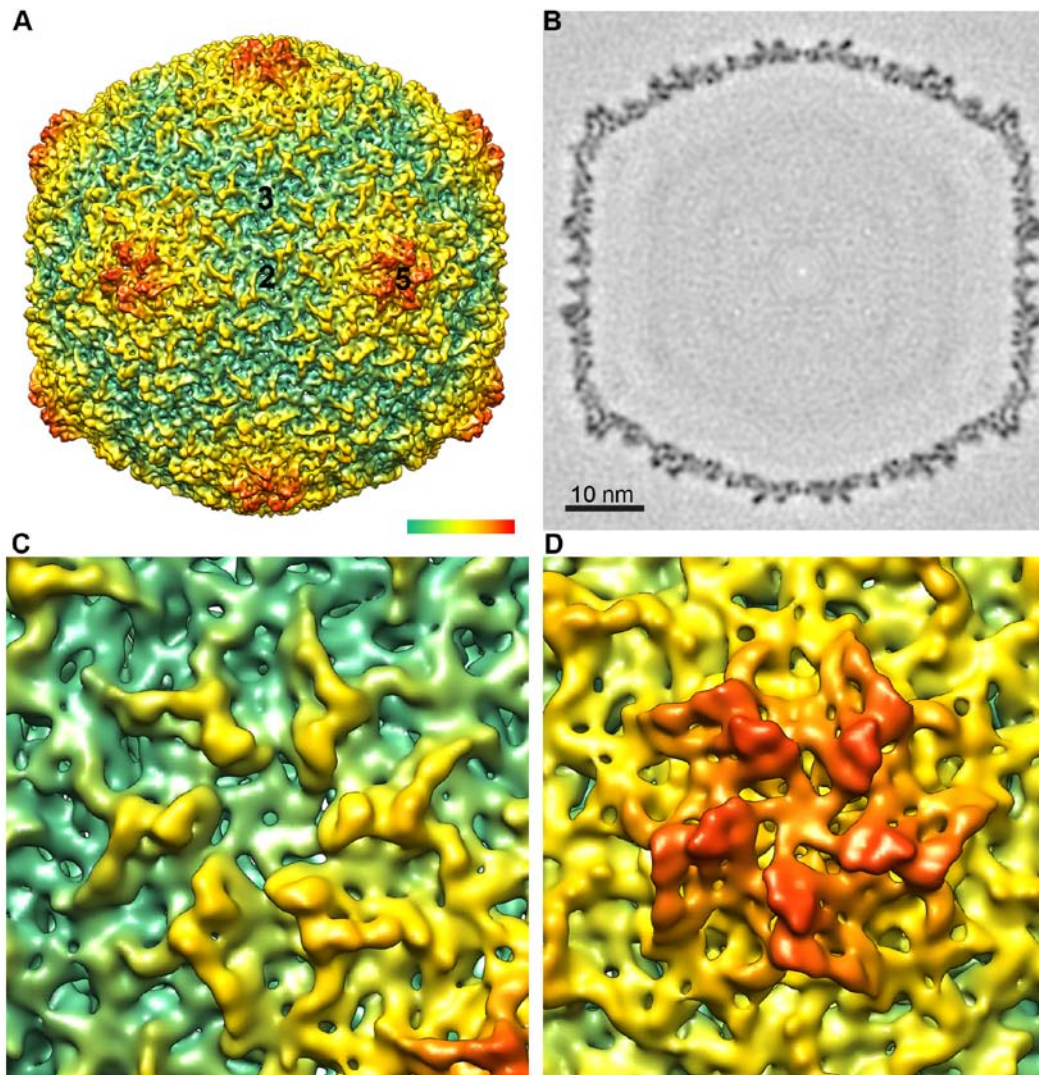


**Figura 4.8: A) Determinación de la resolución de la reconstrucción.** La reconstrucción tiene una resolución calculada en  $1,08 \text{ nm}$  según el criterio de resolución FSC con coeficiente de correlación de  $0,5$  y de  $0,9 \text{ nm}$  según el criterio de  $0,3$ . **B) Representación Guinier.** Salida del programa EM-BFACTOR mostrando el logaritmo natural de las amplitudes con respecto a la resolución ( $\text{\AA}^{-2}$ ) antes (en rojo) y después (en azul) de la corrección del decaimiento.

El mapa final de densidad electrónica del virus maduro sin ADN obtenido por crioME y reconstrucción tridimensional se muestra en la [Figura 4.9A](#).

La cápsida del virus T7 maduro presenta simetría icosaédrica con un número de triangulación  $T=71$ , un diámetro de unos  $60 \text{ nm}$  y un grosor de  $2,5 \text{ nm}$ , con la cara externa más corrugada que la cara interna como se puede apreciar en la [Figura 4.9B](#). La proteína de la cápsida se organiza en 60 hexámeros casi simétricos ([Figura 4.9C](#)) y en 12 pentámeros protuberantes en los ejes de orden 5 ([Figura 4.9D](#)).





**Figura 4.9: Reconstrucción tridimensional de la cabeza madura sin ADN a una resolución de 0,9nm. A)** Vista a lo largo del eje 2 de simetría. Los números indican los ejes 5, 3 y 2 de simetría icosaédrica. La barra de colores representa el código usado para colorear en función del radio de la estructura. **B)** Sección central en el mapa de densidad. **C)** Detalle de un hexón. **D)** detalle de un pentón. El umbral de densidad seleccionado es de  $3\sigma$ .

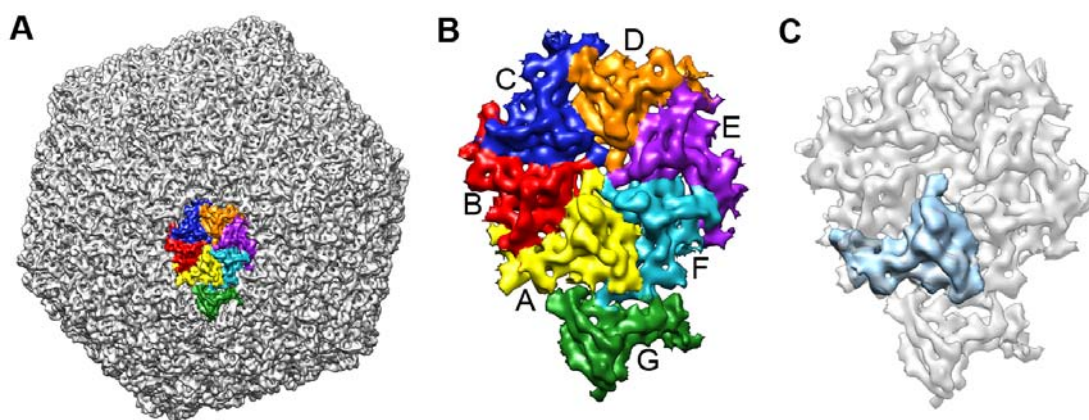
Para validar la estructura obtenida se realizó una comparación con los mapas a baja resolución obtenidas previamente por Ceritelli (Cerritelli et al, 2003) y en nuestro laboratorio (Agirrezabala, 2005 y datos no publicados).

#### 4.3.2 Segmentación de la unidad asimétrica

Definir los bordes y segmentar los componentes individuales de una estructura obtenida mediante reconstrucción por criomicroscopía con resolución nanométrica representa un gran desafío. La segmentación manual de mapas de densidad 3D puede ser un proceso subjetivo, especialmente cuando la resolución de la estructura 3D no es suficiente como para distinguir los límites entre las distintas subunidades. Para delimitar las subunidades se visualizó el mapa a

distintos niveles de densidad, basándonos en la discontinuidad de la densidad entre vecinos. Segmentamos las subunidades de la unidad asimétrica, empezando como se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos, con una estimación aproximada generada manualmente en Chimera y refinamos iterativamente para evitar solapamientos entre subunidades o pérdidas de densidad. La segmentación se mejoró usando un algoritmo iterativo de alineamiento y promediado de cada uno de los monómeros aislados (Agirrezabala et al, 2007). Conforme a este algoritmo cada monómero se alineó con la media (aplicando rotaciones y translaciones) para maximizar el coeficiente de correlación con la media. Durante estos ciclos de refinamiento los coeficientes de correlación de cada monómero respecto al promedio han mejorado desde valores comprendidos entre 0,83 y 0,9 en la primera iteración a valores entre 0,89 y 0,94 en la tercera iteración. Debido a una segmentación inicial coherente solo fueron necesarias 3 iteraciones para conseguir las densidades refinadas de los siete monómeros (seis del hexón y uno del pentón) que forman la unidad asimétrica de la cápsida del bacteriófago T7 con un número de triangulación  $T=71$  (Figura 4.10B).

Para comprobar que la densidad seleccionada corresponde a una sola unidad asimétrica se le aplicó simetría icosaédrica generándose de esta forma la cápsida. En la cabeza madura el monómero del pentámero no se diferencia de los monómeros presentes en los capsómeros hexaméricos. El monómero promedio del hexón se muestra en la Figura 4.10C en el contexto de la unidad asimétrica.

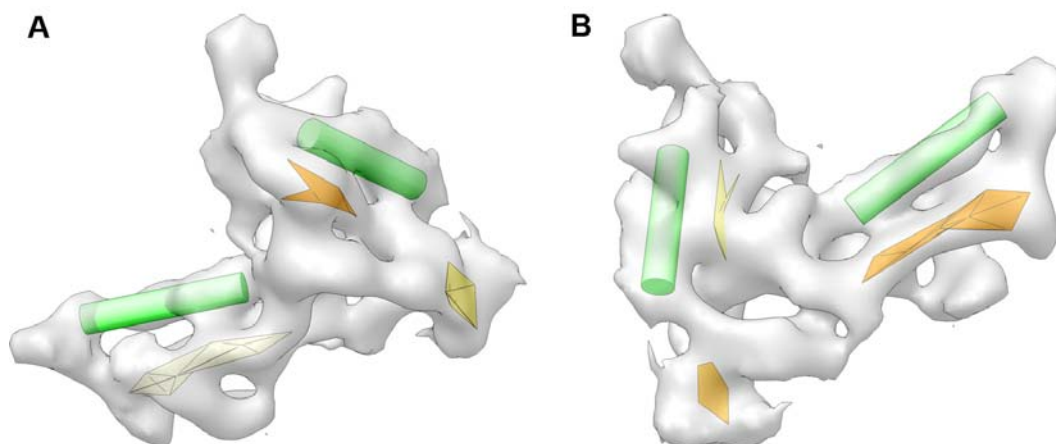


**Figura 4.10: Segmentación de la unidad asimétrica que forma la cápsida del bacteriófago T7.** **A)** representación de la unidad asimétrica (en colores) en el contexto de la cápsida de T7, en gris. **B)** Detalle de la unidad asimétrica. La unidad está formada por un hexámero entero (los monómeros A-F), y un monómero del pentón (monómero G). El código de colores asignado a los monómeros que forman la unidad asimétrica será mantenido a lo largo de toda esta Tesis. **C)** Monómero promedio de la proteína de la cápsida, en azul, sobre la unidad asimétrica en gris.

#### 4.3.3 Predicción de elementos de estructura secundaria

Con el objetivo de detectar elementos de estructura secundaria en nuestro mapa de densidad de la subunidad de la cápsida del virus T7 empleamos el programa AIRS (Baker et al,

2007) que proporciona una interfaz grafica para *SSE Hunter* y *SSE Builder* en el programa Chimera. Este programa se utiliza para analizar de forma automática la presencia y localización de hélices  $\alpha$  y laminas  $\beta$  en mapas de densidad 3D con resoluciones hasta 1 nm. Con esta estrategia se asignaron dos hélices  $\alpha$ , en verde y tres zonas coráminas  $\beta$ , en naranja (Figura 4.11) en nuestro mapa del monómero.



**Figura 4.11: Identificación de elementos de estructura secundaria en el monómero promedio del hexón. A)** Vista desde el exterior de la cápsida. **B)** Vista desde el interior de la cápsida. Las hélices  $\alpha$  están representadas como cilindros verdes y las laminas  $\beta$  como polígonos naranjas.

#### 4.3.4 Generación del modelo atómico de la proteína gp10A y su correspondiente ajuste en el volumen promedio del hexón

El modelo atómico de la proteína gp10A y su correspondiente encaje en el mapa de la media del monómero, fueron llevados a cabo en colaboración con Javier A. Velázquez-Muriel, del Departamento “Bioengineering and Therapeutic Science” de la Universidad de California, San Francisco.

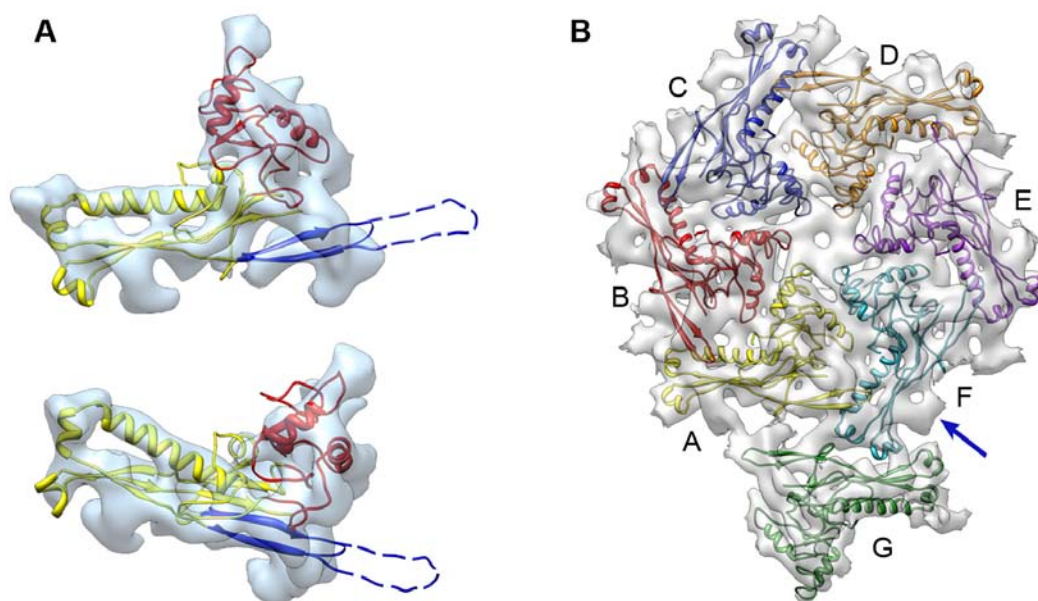
En base a la similitud en el plegamiento de las proteínas que forman la cápsida del virus T7 (gp10A) y HK97 (gp5) se usaron las coordenadas de la estructura atómica de gp5 (PDB ID: 1ohg), resueltas por cristalografía de rayos X (Helgstrand et al, 2003; Wikoff et al, 2000), para generar un modelo atómico de gp10A. Esta estrategia se había usado previamente en nuestro laboratorio (Agirrezabala et al, 2007) para generar un modelo de la proteína mayoritaria de la cápsida de la precabeza de T7. Se alinearon los residuos Leu100-Glu345 de la proteína gp10A de T7 con los que forman la proteína gp5 de HK97 (Leu133-Pro373) y este alineamiento se usó en el programa MODELLER (Sali & Blundell, 1993) para generar por homología un modelo de la gp10A. Con este modelo se llevó a cabo un ajuste flexible en el mapa promedio del monómero de la proteína de la cápsida, tal y como se describe en el capítulo Materiales y Métodos.

Siguiendo la nomenclatura descrita para gp5 (Wikoff et al, 2000), el modelo de la proteína gp10A (residuos 100-345) consiste en el dominio A (residuos 210-300) en rojo, dominio P



(residuos 100-119, 154-209 y 301-345) en amarillo y en el dominio lazo E (residuos 120-153) en azul, tal como se muestran en la [Figura 4.12A](#). En términos de elementos de estructura secundaria, el dominio A estaría formado por dos hélices  $\alpha$ , el dominio P por una hélice  $\alpha$  larga, dos hélices  $\alpha$  cortas y una zona de laminas  $\beta$ . Las predicciones de estructura secundaria que se hicieron con *SSE Hunter* ([Figura 4.11](#)) se ven reflejadas en este modelo. Parte del lazo E (línea discontinua en la [Figura 4.12A](#)), se eliminó del modelo inicial al no existir densidad electrónica en el mapa promedio del monómero.

El modelo obtenido fue empleado posteriormente para construir un modelo pseudoatómico de la subunidad asimétrica ([Figura 4.12B](#)). Cada monómero de la unidad asimétrica se refinó por separado en su correspondiente densidad experimental.



**Figura 4.12: Modelo atómico para la proteína de la cápsida, gp10A.** **A)** Ajuste del modelo atómico de la proteína gp10A en la densidad promedio de los monómeros hexaméricos. Arriba tenemos una vista desde el exterior de la cápsida. Los distintos dominios del modelo están representados en colores: el dominio A, rojo; el dominio P, amarillo y el dominio lazo E, azul. **B)** ajuste del modelo atómico en la unidad asimétrica de la cabeza madura. La flecha azul marca la zona que podría corresponder al resto del lazo E.

En el mapa de la unidad asimétrica se observa una densidad electrónica vacía, marcada con la flecha azul en la [Figura 4.12B](#). La proximidad entre esta densidad vacía y el lazo E del modelo atómico de cada subunidad adyacente sugiere la posibilidad de que esta densidad podría acomodar el resto del lazo E quitado anteriormente.

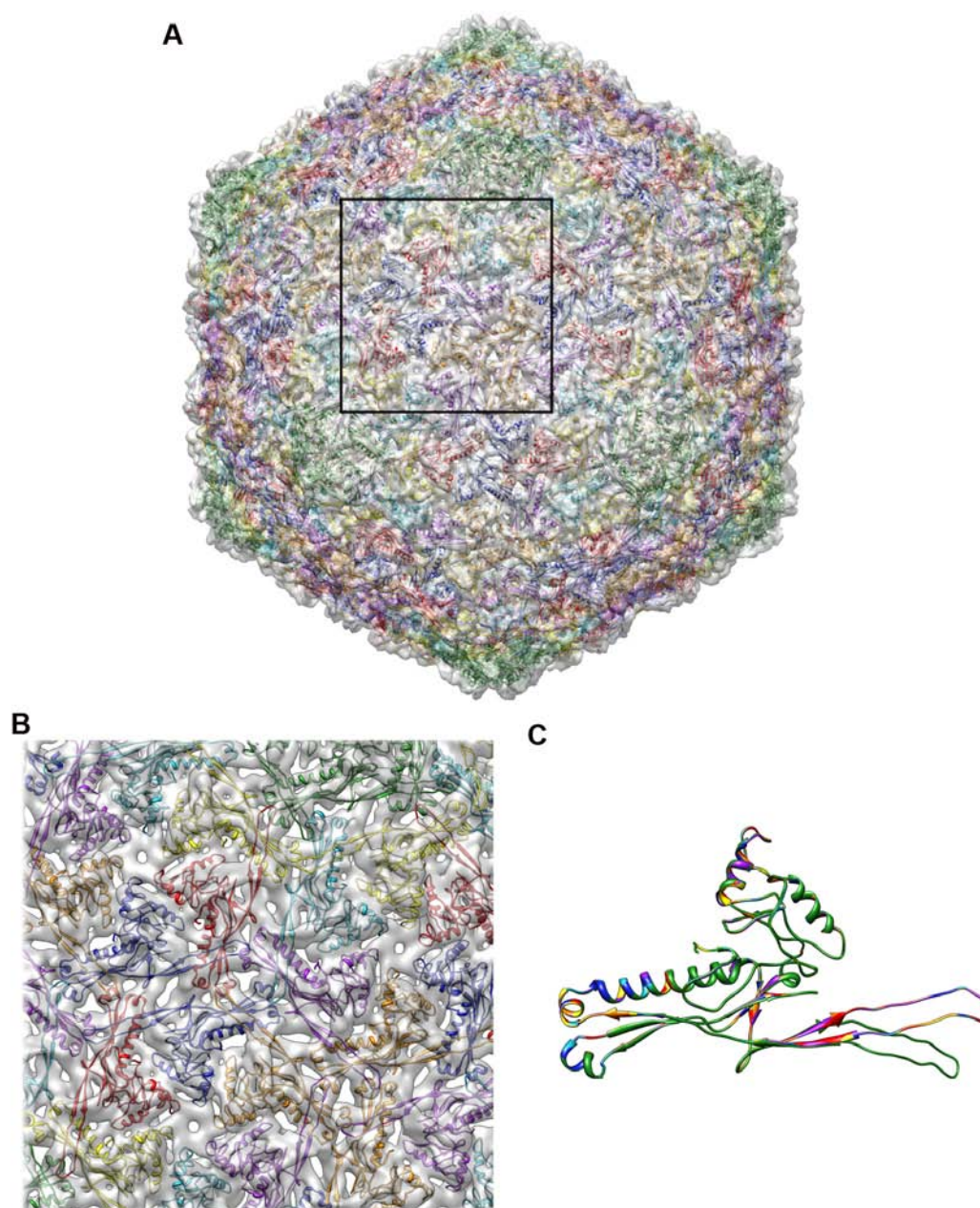
El modelo pseudoatómico para la cápsida completa se obtuvo aplicando simetría icosaédrica al modelo de la unidad asimétrica, seguido de un refinamiento global con Uro. Para el refinamiento con Uro se asumió simetría icosaédrica y se consideraron las siete moléculas que forman la unidad asimétrica del fago T7 como cuerpos rígidos. Para cuantificar la calidad del ajuste se calcularon los coeficientes de correlación global y local, asumiendo como coeficiente global el valor debido a todos y cada uno de los píxeles del volumen a la hora de



hacer el cálculo, mientras que en el caso del coeficiente de correlación local el cálculo se realiza teniendo en cuenta solo los píxeles de una zona determinada de la estructura y en cual la estructura atómica está presente. Se obtuvo un valor de 0,7 para el coeficiente de correlación global y de 0,81 para el coeficiente de correlación local, lo que respaldan un buen ajuste del modelo pseudoatómico en el mapa de densidad electrónica.

Previamente a esta simetrización se añadieron los lazos E de cada subunidad de la unidad asimétrica como se ha descrito en el capítulo Materiales y Métodos.

En la [Figura 4.13A](#) se observa el ajuste del modelo pseudoatómico en el mapa de densidad para la cápsida entera del bacteriófago T7 maduro.



**Figura 4.13: Modelo pseudoatómico para la cápsida de T7. A)** Ajuste del modelo pseudoatómico de la cápsida en el mapa densidad electrónica. **B)** Detalle de la zona indicada en el cuadrado, centrada en un eje cuasi 3 de simetría. **C)** Solapamiento de los siete modelos de la unidad asimétrica.

La zona del eje cuasi 3 de simetría marcada en el cuadrado negro se ve ampliada en la [Figura 4.13B](#) y respalda un buen ajuste del modelo final a las características del mapa de crioME. El modelo pseudoatómico de la cápsida madura releva contactos extensos entre subunidades, con el dominio A implicado en las interacciones entre monómeros del mismo capsómero y el dominio P participando sobretodo en los contactos entre capsómeros distintos.

El alineamiento de las siete subunidades monoméricas diferentes, para ver la variabilidad en los distintos puntos del mapa, mostró un buen solapamiento excepto en el lazo E pentamérico que presenta una curvatura de unos 30° hacia el interior de la cápsida ([Figura 4.13C](#)). Esta conformación es responsable formar de la curvatura de la cápsida alrededor de los ejes de simetría de orden 5. En el caso del bacteriófago épsilon15 se había descrito una variación similar entre el lazo E del pentámero y de los hexámeros (Jiang et al, 2008).

## 4.4 Cambios estructurales durante la maduración del bacteriófago T7

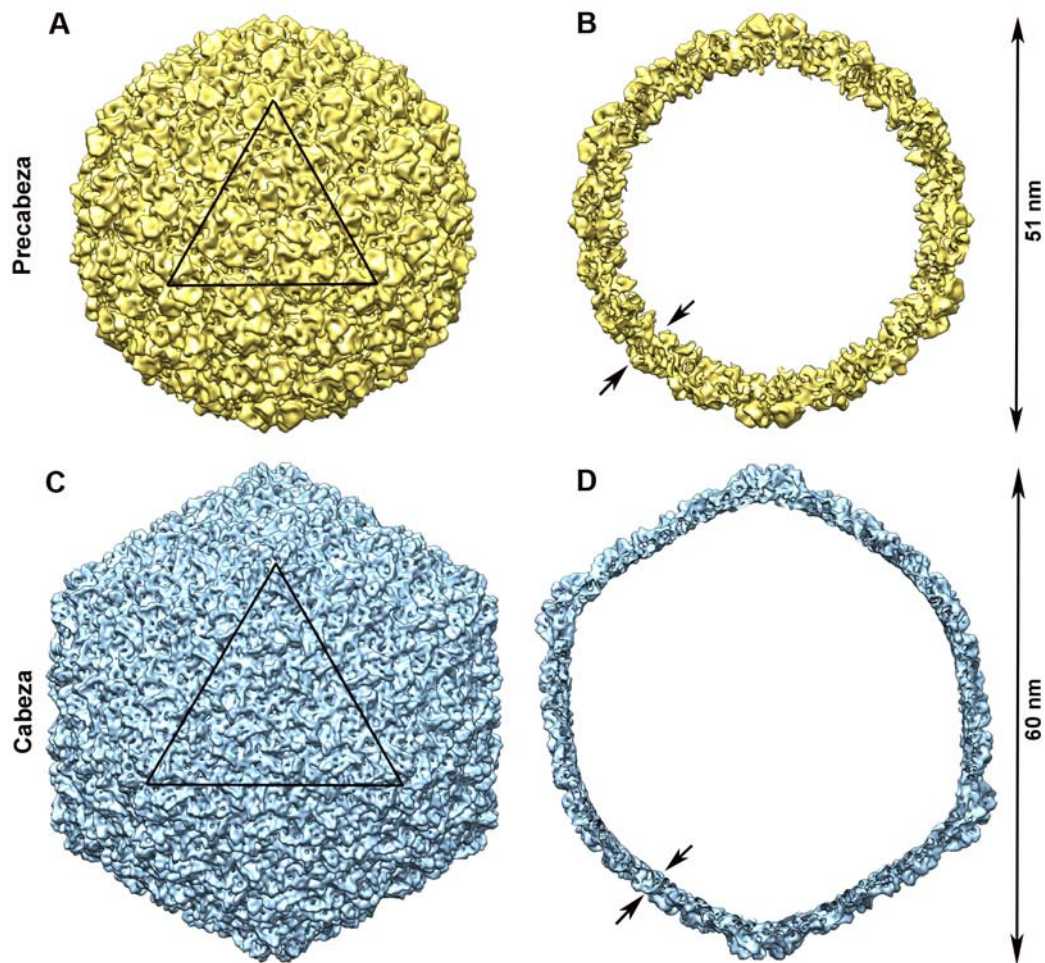
El proceso de maduración de la precabeza del bacteriófago T7 conlleva importantes cambios conformacionales en la cápsida. Para describir estos cambios tenemos que comparar las reconstrucciones tridimensionales de la precabeza y de la cabeza madura. La resolución del mapa de la cabeza madura alcanzada en este trabajo es similar a la de la precabeza, previamente publicada por nuestro grupo ([Agirrezabala et al, 2007](#)), lo que permite una comparación directa entre estas dos estructuras. Recientemente se ha publicado la estructura atómica de la proteína gp5 que forma la precabeza del bacteriófago HK97 ([Gertsman et al, 2009](#)), lo que ha planteado una nueva modelización de la proteína gp10A de la precabeza del bacteriófago T7, ya que el modelo anterior se basó en la estructura atómica de la proteína gp5 pero en su estadio de cabeza madura. Por consiguiente, se generó un nuevo modelo atómico para la proteína de la precabeza de T7 como se ha descrito en el capítulo Materiales y Métodos y se observó que el modelo obtenido era prácticamente idéntico al publicado anteriormente ([Agirrezabala et al, 2007](#)) con mínimas reasignaciones de algunos residuos en la estructura secundaria. En esta tesis se usó este nuevo modelo para todos los estudios comparativos precabeza-cabeza madura.

### 4.4.1 Cambios globales de la cápsida

El principal efecto de la maduración es el cambio estructural que sufre la cápsida. Estos cambios se ven reflejados fundamentalmente en el tamaño de la partícula, en la forma y en la estructura de los capsómeros.

Como se aprecia en la [Figura 4.14](#) la precabeza sufre una remodelación global, madurando desde una formación casi esférica hacia una de apariencia más poliédrica y de mayor tamaño. Estos cambios globales implican un aumento del diámetro de la cápsida desde 51 nm que mide

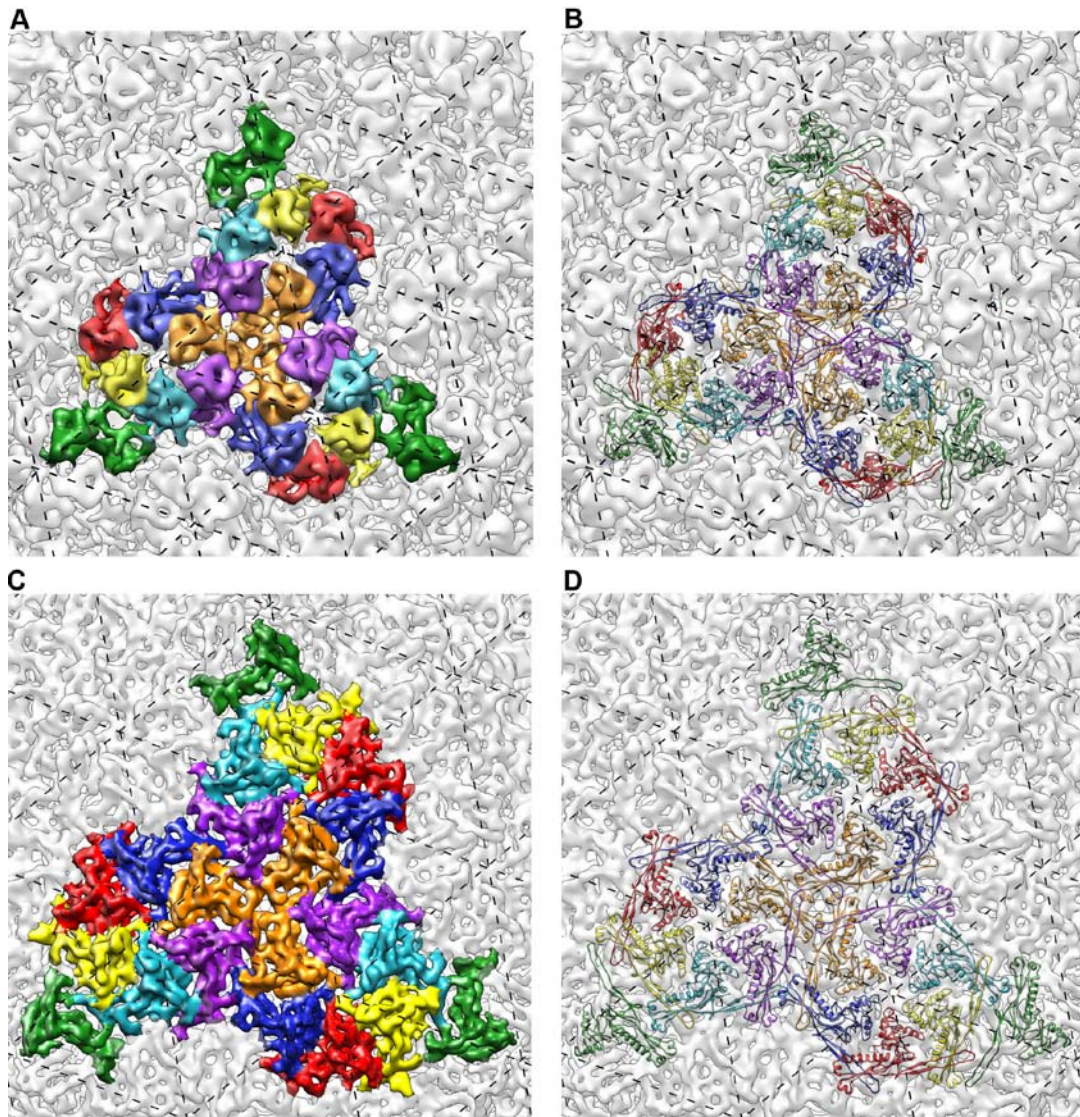
la precabeza a 60 nm en el caso de la cabeza madura y una disminución del grosor de la cápsida, que llega a medir 2,3 nm en el caso de la cabeza madura frente a los 4,5 nm de la precabeza.



**Figura 4.14: Maduración del bacteriófago T7 a nivel global.** **A)** Estructura de la precabeza vista desde el eje 3 de simetría (Agirrezabala et al, 2007). El triángulo marca una cara del icosaedro. **B)** Sección central de la precabeza, con un grosor de la cápsida, marcado por las flechas, de 4,5 nm. **C)** Estructura de la cabeza madura vista desde el eje 3 de simetría. **D)** Sección central de la precabeza, con un grosor de la cápsida, marcado por las flechas, de 2,3 nm. El código de colores será conservado en las siguientes figuras, representando en amarillo estructuras relacionadas con la precabeza y en azul, con la cabeza.

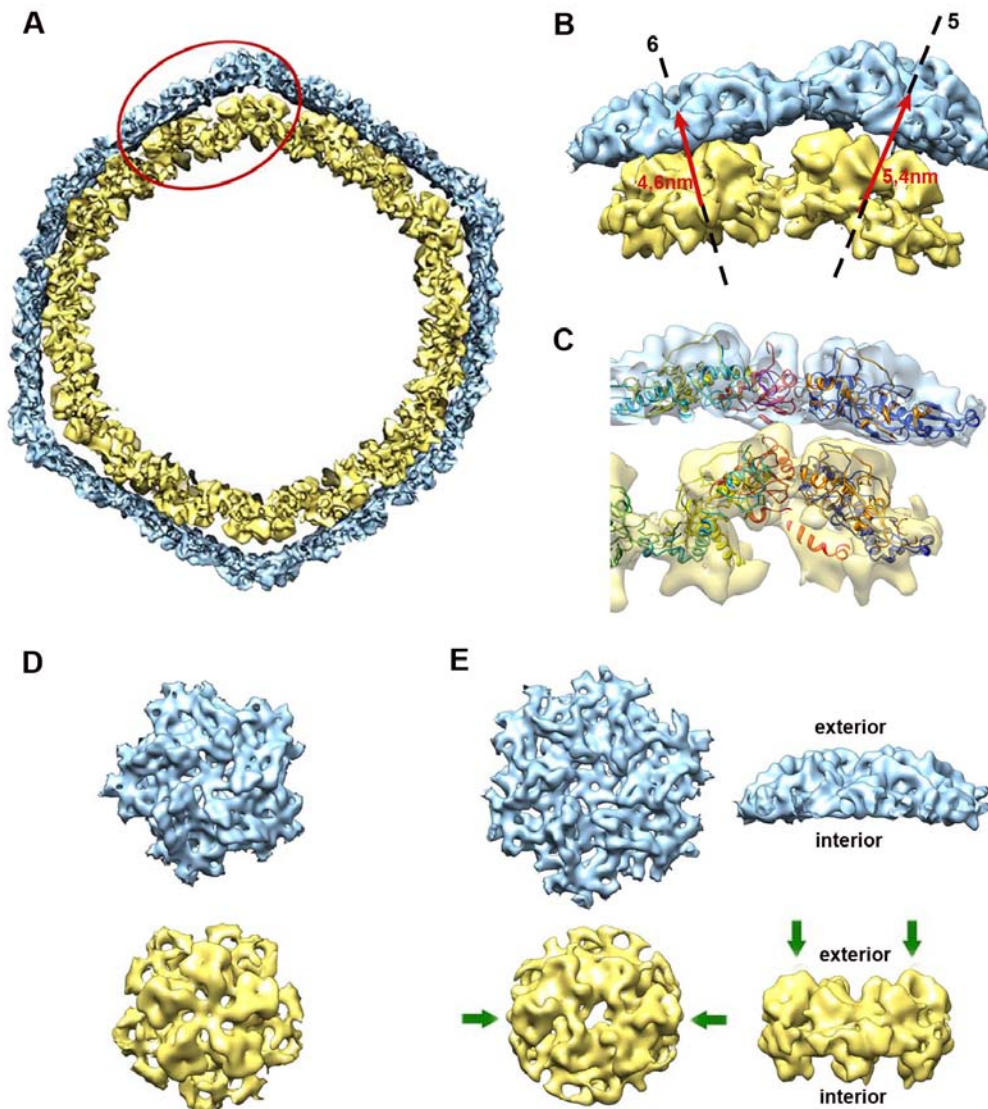
Como se detalla a continuación se observan cambios en la orientación de los monómeros en el plano de la cápsida. Los monómeros del hexámero que siguen una distribución sesgada, elíptica con un pseudo eje 2 de simetría, sufren una rotación media en plano de  $30^\circ$ , lo que da lugar a un incremento de la distancia intercapsomérica de 11 a 13,4 nm y una expansión de 25% del diámetro del hexón (Figura 4.15). Las subunidades pentaméricas presentan simetría 5 tanto en el caso de las precabezas como en la cabeza madura y tienen un movimiento similar con una rotación en plano de aproximadamente  $16^\circ$ , lo que hace aumentar el diámetro del pentámero de 9,2 a 11,4 nm (una expansión de 24%).





**Figura 4.15: Red icosaédrica de la cápsida.** **A)** y **B)** Están representadas tres unidades asimétricas que forman una cara de la capsida T=7l de la precabeza. **C)** y **D)** Están representadas tres unidades asimétricas que forman una cara de la capsida T=7l de la cabeza madura. El código de colores es el mismo que en la [Figura 4.10B](#). La densidad electrónica se muestra con un umbral de 3σ.

La expansión de la cápsida ([Figura 4.16A](#)) conlleva además, un desplazamiento de los capsómeros hexaméricos hacia el exterior de unos 4,6 nm, mientras que los pentaméricos lo hacen 5,4 nm ([Figura 4.16B](#)). El mayor desplazamiento de los pentámeros tiene como consecuencia que los vértices se hagan más prominentes. La curvatura general de la cápsida aumenta en el caso de la cabeza madura a 154° frente a los 147° de la precabeza.



**Figura 4.16: Cambios estructurales implicados en la maduración de la cápsida. A)** Sección central de la precabeza (amarillo) y cabeza madura (azul). **B)** Vista tangencial a la superficie de la cápsida mostrando, con las flechas rojas, el desplazamiento de los capsómeros hacia el exterior. Los números (5) y (6) marcan el pentámero y el hexámero respectivamente. **C)** Corte en un hexón, tangencial a la superficie de la cápsida. **D)** Vista frontal del pentón de la precabeza (amarillo) y de la cabeza (azul). **E)** A la izquierda el hexón de la precabeza (amarillo) y de la cabeza (azul) en vista frontal. A la derecha tenemos los respectivos hexones en vista lateral. Las flechas verdes marcan los dos monómeros del hexón que sobresalen.

Los monómeros de los capsómeros tienen una orientación radial en la precabeza que hace que la cápsida tenga un grosor de 4,5 nm (Figura 4.16A y B). Durante la transición hacia la cápsida madura los monómeros del hexón cambian esta orientación, pasando de una distribución radial a una orientación más plana en la superficie de la cápsida. Dependiendo de su posición relativa dentro del capsómero hexamérico cada monómero se mueve más o menos hacia el exterior y el dominio P de cada uno sufre una inclinación hacia el plano de la cápsida que oscila entre 10 y 22° (Figura 4.16C). En las subunidades pentaméricas, el dominio P se inclina menos, unos 10°, lo que hace que después de madurar los monómeros del pentón sigan con una disposición radial muy similar a la que tenían en la precabeza. (Figura 4.16B).

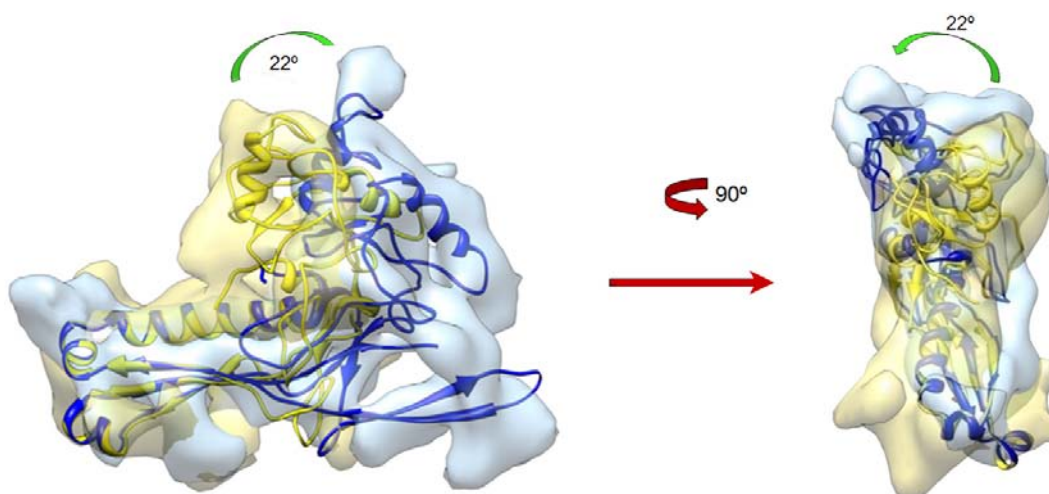


El dominio A, que sobresale más en la precabeza, pasa a orientarse de forma tangencial a la superficie en la cabeza, lo cual se traduce en una cápsida menos rugosa. De esta forma se genera una reorganización de los monómeros dentro de los capsómeros en la cabeza respecto a la precabeza. Por otra parte, en la precabeza los monómeros del hexón están a diferentes alturas. En la vista lateral del hexón (Figura 4.16E), se aprecia que los dos monómeros que forman el eje 2, marcados con flechas verdes, son más altos que los otros cuatro. Durante el proceso de maduración los hexámeros pasan a situarse en el mismo plano.

Todos estos cambios y reorganizaciones implicados en la maduración del bacteriófago T7 dan lugar a una cápsida poliédrica, de mayor tamaño y de menor grosor de la pared.

#### 4.4.2 Cambios en la proteína de la cápsida gp10A

A nivel molecular, el cambio más significativo observado en la estructura de la proteína de la cápsida gp10A de la cabeza madura con respecto a la de la precabeza es la inclinación de 22° (“bending”) del dominio A respecto al dominio P (Figura 4.17), lo que hace que este se sitúe casi paralelo a la superficie de la cápsida.



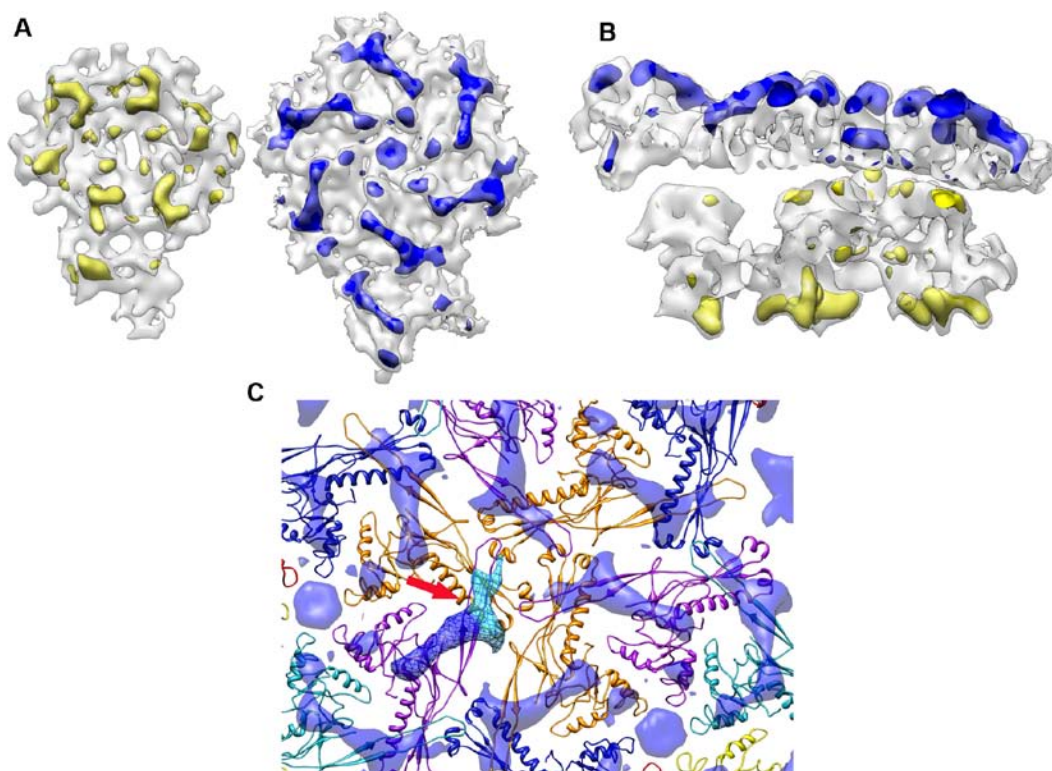
**Figura 4.17: Comparación de la proteína de la cápsida, gp10A entre los estados precabeza y maduro.** Alineamiento de los modelos atómicos de la proteína gp10A de la precabeza (amarillo) y de la cabeza (azul) con sus correspondientes mapas de densidad. Se resalta el “bending” del dominio A relativo al dominio P.

Además de la inclinación del dominio A respecto al dominio P, hemos observado otras diferencias en el plegamiento de la proteína gp10A. El modelo atómico presentado aquí para la estructura de la proteína gp10A no contiene el dominio amino terminal (residuos 1-100), dada la baja identidad de secuencia en esta región de gp10A con su homólogo en HK97. Así pues, generamos un mapa de diferencia entre el volumen experimental de criome y el volumen generado en base al modelo atómico de gp10A, con la intención de localizar el dominio amino terminal. Los resultados obtenidos muestran que el volumen diferencia se localiza en la parte

interna de la superficie de la cápsida en el caso de la precabeza (Agirrezabala et al, 2007) y en la parte externa en la cabeza madura (Figura 4.18A y B).

En la cabeza madura, la zona de mayor diferencia observada para cada monómero adopta una forma en “L” (zona señalada con flecha roja en la Figura 4.18C). Consideramos que esta densidad podría estar formada por dos dominios casi perpendiculares como se detallan a continuación. El dominio más largo (en azul oscuro) está cerca de la posición del amino terminal del modelo atómico de gp10A (mostrado en morado en la Figura 4.18C) y su volumen ( $11 \text{ nm}^3$  para  $3\sigma$ ) podría acomodar los 100 aminoácidos que conforman el dominio amino terminal (asumiendo una densidad media de proteínas de  $\sim 1.38 \text{ g/cm}^3$ ). El dominio más corto (en azul claro) podría acomodar la parte del dominio lazo E que se eliminó del modelo inicial (línea discontinua en la Figura 4.12A). Esta posición sugiere que podría estar implicado en reforzar las interacciones alrededor de los ejes de simetría 3 y cuasi tres lo que confirmaría la hipótesis que se propuso para la precabeza (Agirrezabala et al, 2007).

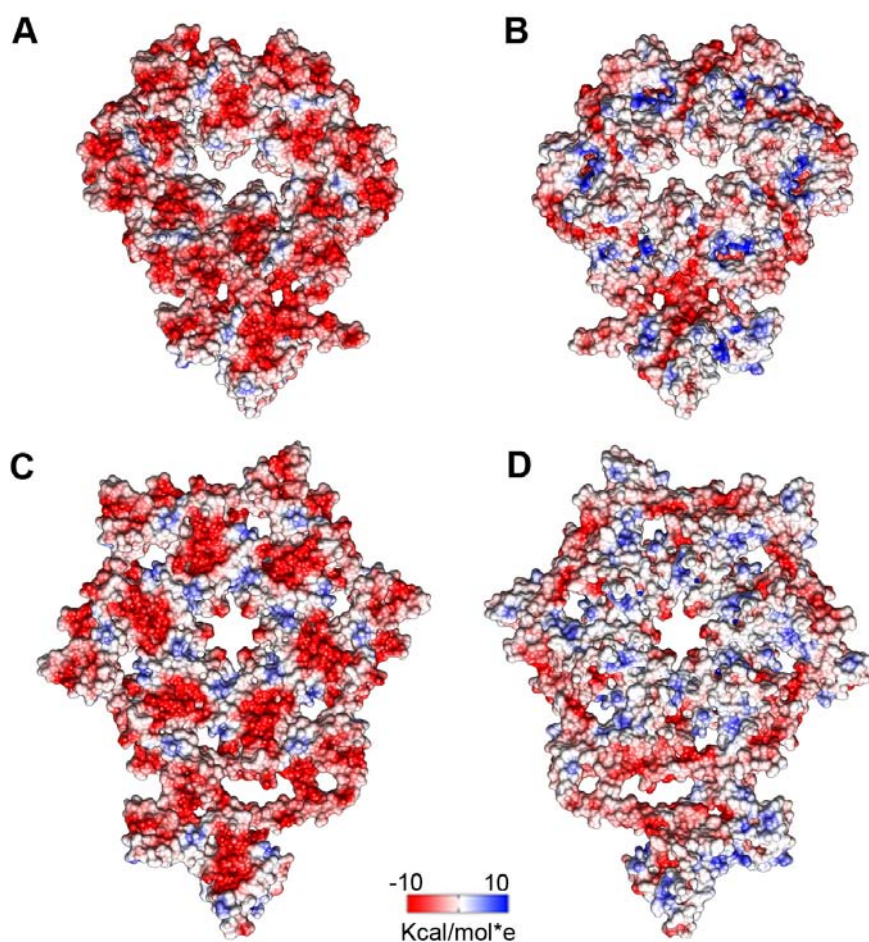
A esta resolución no es posible determinar si los cambios en la estructura de la proteína de la cápsida, gp10A conllevan cualquier torsión/inclinación de las propias  $\alpha$ hélices o de las laminas  $\beta$ , como se ha descrito recientemente para HK97 (Gertsman et al, 2009).



**Figura 4.18: Mapas de diferencia para la precabeza y la cabeza. A)** Mapas diferencia entre las densidades experimental y modelada, para las subunidades asimétricas de la precabeza (izquierda) y de la cabeza (derecha). Para la precabeza es una vista desde el interior de la cápsida, mientras que para la cabeza es una vista desde el exterior. Los mapas de diferencia se visualizan a una densidad de  $5\sigma$ . **B)** Vista lateral de las subunidades asimétricas. **C)** Mapa de diferencia para la cabeza alrededor del eje 3 de simetría, lo que implican tres copias idénticas del monómero D (Figura 4.12B). En azul oscuro se marca el volumen que se atribuye al dominio N terminal y en azul claro el volumen que correspondería al dominio lazo E.

#### 4.4.3 Cambios del potencial electrostático superficial

Otra de las consecuencias que supone la maduración del virus T7, debido a la reorganización estructural de la cápsida, es el posible cambio de las propiedades electrostáticas de las superficies interior y exterior de la cápsida. La cara interna de la precabeza está casi en su totalidad cargada negativamente, mientras que en la cabeza madura se observa la presencia de cargas positivas (Figura 4.19A y C). Esto implica que podrían establecerse nuevos contactos entre la cara interna de la cápsida y la última capa de ADN, tanto durante el proceso de empaquetamiento del ADN como en la partícula viral infectiva. Respecto a la parte externa de la cápsida se observa una distribución de las cargas en toda la superficie y no hay prácticamente cambios entre la precabeza y la cabeza madura (Figura 4.19B y D).



**Figura 4.19: Representación del potencial electrostático superficial de la unidad asimétrica.** A) La superficie interna de la precabeza. B) La superficie externa de la precabeza. C) La superficie interna de la cabeza. D) La superficie externa de la cabeza. La carga negativa está representada en rojo y la carga positiva en azul.



#### 4.4.4 Cambios en las interacciones entre monómeros

Los movimientos y la reorganización de las subunidades de la cápsida durante el proceso de maduración del bacteriófago T7 inducen cambios en las interacciones, tanto a nivel intracapsomérico como a nivel intercapsomérico.

Para las interacciones intracapsoméricas, los principales contactos entre los monómeros del pentón se dan entre el dominio P de una subunidad y el lazo E de la subunidad adyacente, siendo de naturaleza hidrófoba, como se muestra en la [Tabla 4.2](#).

	Precabeza						Cabeza	
	Dominio A			Dominio P			Dominio A	Dominio P
<b>Pentámero</b>	-			principalmente hidrófobo			polar cargado	principalmente hidrófobo
<b>Hexámero</b>	A-B/D-E	B-C/ E-F	C-D/ F-A	A-B/ D-E	B-C/ E-F	C-D/ F-A	polar	principalmente hidrófobo
	-	polar cargado	polar cargado	Hidrófobo/polar	principalmente hidrófobo	principalmente hidrófobo	polar	principalmente hidrófobo

**Tabla 4.2: Contactos intracapsoméricos.** Se han considerado para estimar estos contactos los residuos situados a distancias < 0,4nm. Los monómeros siguen la nomenclatura de la [Figura 4.12](#).

<b>Precabeza</b>	zona polar cargada
<b>Cabeza</b>	zona polar cargada

**Tabla 4.3: Contactos alrededor del eje 3 de simetría.** Se han considerado para estimar estos contactos los residuos situados a distancias < 0,4nm.

	<b>Precabeza</b>	<b>Cabeza</b>
A-B	3,4	13,1
B-C	11,4	10,7
C-D	8,7	11,1
D-E	2,8	11,4
E-F	10,5	12,2
A-F	9,2	9,9

Valores para las subunidades del hexón

	<b>Precabeza</b>	<b>Cabeza</b>
Dhex2-Dhex3	0,4	3,2
Dhex2-Dhex1	0,4	3,1
Dhex1-Dhex2	0,4	3,2

Valores alrededor de los ejes 3 de simetría

	<b>Precabeza</b>	<b>Cabeza</b>
G-G	7,7	11,4

Valores para las subunidades del pentón

	<b>Precabeza</b>	<b>Cabeza</b>
A-G	4,1	1,1
F-G	0,7	3,5
B-G	2,2	-

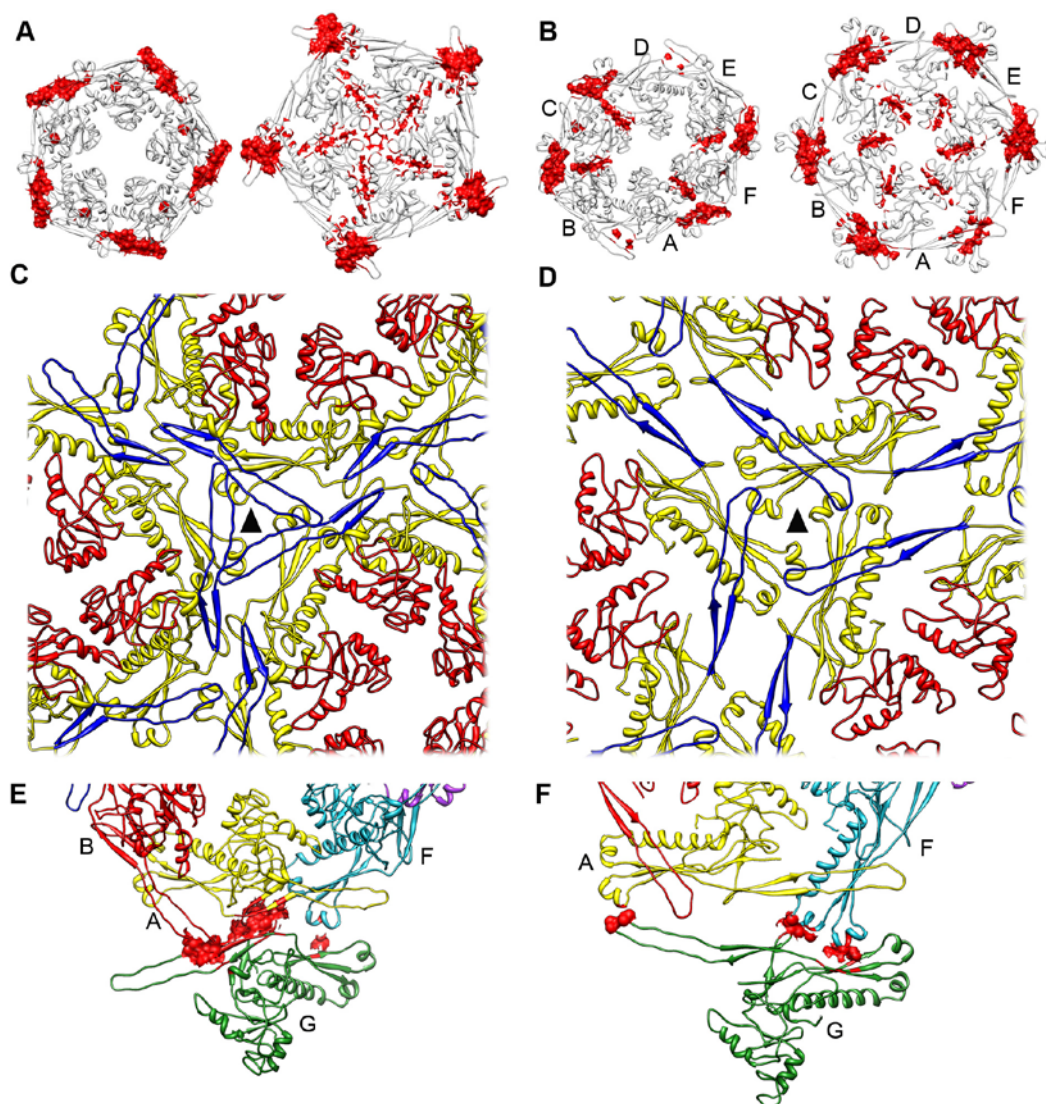
Valores para la interacción hexón-pentón

**Tabla 4.4: Valores para las superficies de interacción entre monómeros.** : Los valores están en nm<sup>2</sup> y se determinaron con el programa PISA. Los monómeros siguen la nomenclatura de la [Figura 4.12](#).

En el caso del pentámero de la cabeza madura, observamos áreas de contacto suplementarias, principalmente polares y cargadas, en el dominio A (Figura 4.20A). Esto se ve reflejado en un incremento significativo del área de contacto entre los monómeros adyacentes del pentámero, desde los 7,7 nm<sup>2</sup> para la precabeza a unos 11,5 nm<sup>2</sup> para la cabeza (Tabla 4.4).

En el caso del hexámero, el área de los contactos entre monómeros también aumenta (Figura 4.20B y Tabla 4.4). El patrón de las interacciones para el capsómero hexamérico de la precabeza refleja el eje de simetría pseudobinaria. Los contactos de los dominios A son en general polares y cargados, mientras que los contactos del dominio P son principalmente hidrófobos (Tabla 4.2). En la cápsida madura las interacciones exhiben casi una simetría 6, como cabría de esperar, con un incremento de la superficie de contacto. Este aumento se debe al aumento de interacciones en el dominio A después de la reorganización de los capsómeros.

Los contactos intercapsoméricos se dan entre capsómeros pentaméricos y hexaméricos o sólo entre capsómeros hexaméricos como habíamos visto en la Figura 1.11 del capítulo Introducción. Los contactos que implican sólo hexones, están centrados sobre los ejes de simetría 3 y cuasi 3 y participan residuos mayoritariamente polares y cargados (Tabla 4.3). En la precabeza están involucrados en la interacción, el dominio P de una subunidad (los residuos 172-165 y 321-328), el dominio P de la subunidad vecina junto con interacciones adicionales de ambos dominios con el dominio lazo E de la subunidad adyacente (Figura 4.20C). El patrón de las interacciones se mantiene tras la maduración (Figura 4.20D), aunque el área de interacción entre los monómeros aumenta de 0,4 nm<sup>2</sup> a 3,2 nm<sup>2</sup>. Las interacciones intercapsoméricas entre hexámero y pentámero también sufren modificaciones. En la precabeza, hay tres tipos diferentes de contactos entre los monómeros A/G, F/G y B/G (Figura 4.20E). En la cápsida madura, los contactos se dan entre los monómeros F/G (lazo P/dominio P) y los monómeros A/G (lazo P/lazo E) (Figura 4.20F).



**Figura 4.20: Cambios de las interacciones durante la maduración de la cápsida de T7.**

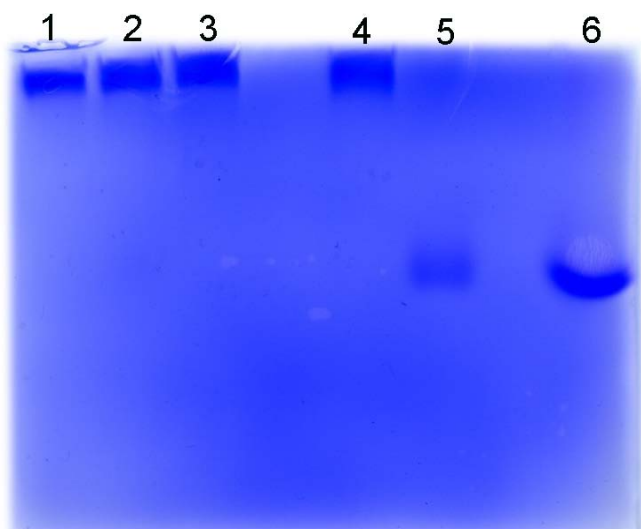
En todos los casos a la izquierda se muestra la estructura referente a la precabeza y a la derecha la referente a la cabeza. **A)** Vista, desde el exterior de la cápsida, de superficies de contacto en el pentámero (en rojo). **B)** Vista, desde el exterior de la cápsida, de superficies de contacto en el hexámero (en rojo). **C)** y **D)** Interacciones alrededor del eje 3 de simetría (triángulo) entre precabeza y cabeza respectivamente. Los monómeros están coloreados por dominios respetando el código de colores establecido en la [Figura 4.12A](#). **E)** y **F)** Los residuos implicados en las interacciones pentón-hexón.

## 4.5 Análisis de la estabilidad global de la cápsida de T7

Como siguiente paso se estudió la estabilidad global de las cápsidas del bacteriófago T7 mediante su comportamiento frente a agentes orgánicos como urea y clorhidrato de guanidina (GuHCl). A pesar de que el uso de estos dos agentes orgánicos está muy extendido en los procesos de desnaturalización de proteínas, aun no se conocen bien sus mecanismos de acción. Los estudios indican que los dos agentes desnaturalizantes actúan solvatando las regiones hidrófobas de la proteína (England & Haran, 2011). El GuHCl es una sal monovalente que tiene tanto efectos iónicos como caotrópicos, mientras que la urea tiene sólo efectos caotrópicos (Fan

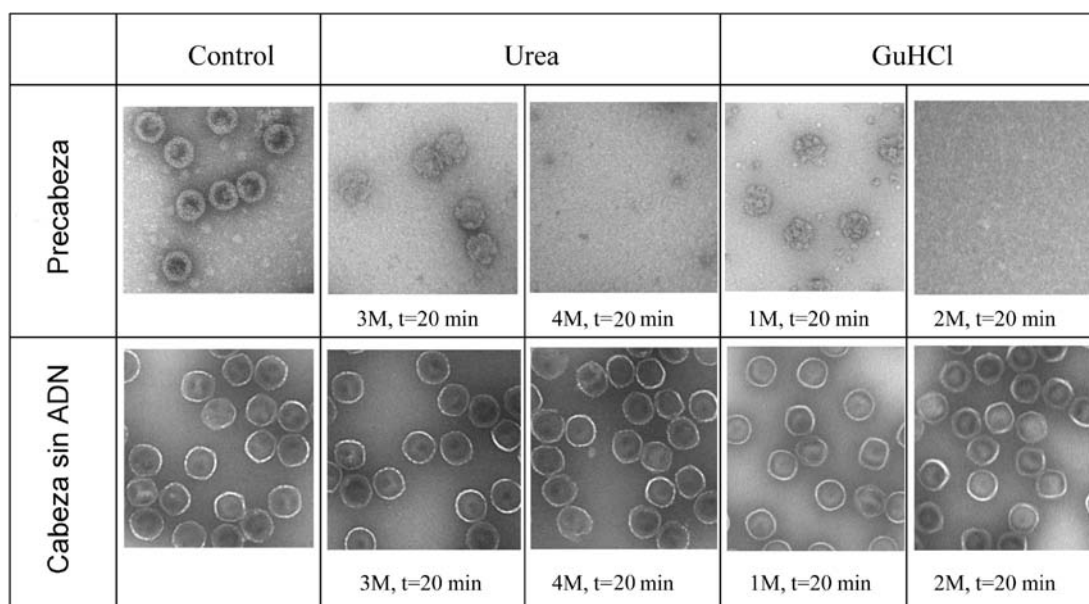
et al, 1999). Por lo tanto, la urea es un control ideal para distinguir entre los efectos iónicos o caotrópicos del GuHCl. Usamos como muestras precabezas y cabezas maduras vacías del bacteriófago T7 ya que se quiso analizar la estabilidad de la cápsida como contenedor sin la influencia del material genético y así hay una cierta equivalencia entre las dos estructuras precabezas y cabezas respectivamente. Las precabezas se obtuvieron como se ha descrito en el capítulo Materiales y Métodos, usando el fago mutante en el gen de la polimerasa vírica (gp5), lo que permite la acumulación de precabeza en el interior de la célula y su posterior purificación mediante un gradiente de sacarosa seguido de un gradiente isopícnico de cloruro de cesio.

Mediante el análisis de electroforesis en gel de agarosa en condiciones nativas se observa que el tratamiento con urea no afecta la estabilidad de la cápsida (Figura 4.21). Por el contrario, en el caso de las cabezas tratadas con 6M GuHCl durante 30 minutos destaca la aparición de una única banda a la altura de las cápsidas previamente desnaturalizadas con SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol lo que demostraría que las cápsidas se encuentran completamente desnaturalizadas y dicha banda correspondería al monómero desensamblado.



**Figura 4.21: Análisis en gel nativo de agarosa de las cabezas maduras tratadas con urea o GuHCl. 1- control cabezas vacías; 2- urea 6M, tiempo 0; 3- urea 6M, 30 min; 4- GuHCl 6M, tiempo 0; 5- GuHCl 6M 30 min; 6- cabezas vacías con buffer desnaturalizante.**

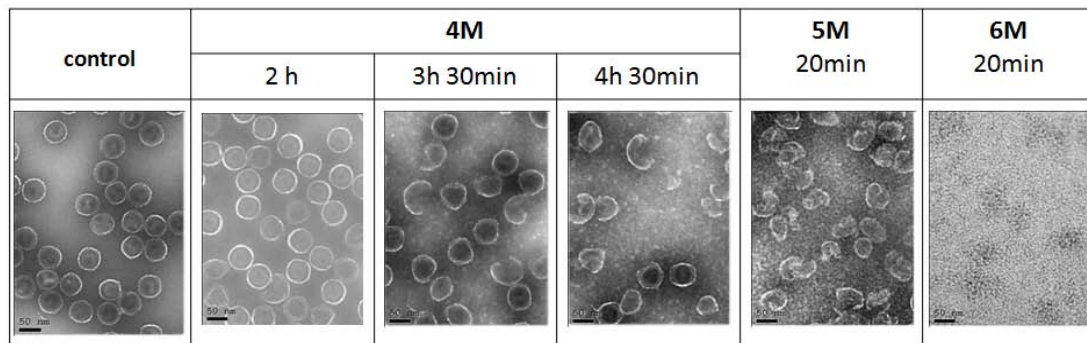
A la vista de estos resultados se realizaron distintos ensayos a 37 y 60°C utilizando diferentes concentraciones de urea y GuHCl y diferentes tiempos de reacción. Estos tratamientos fueron caracterizados mediante microscopía electrónica y tinción negativa. Los resultados que tenemos en estos momentos son preliminares ya que los experimentos están en fase inicial, pero los datos más significativos de la comparación precabeza-cabeza madura se muestran en la Figura 4.22.



**Figura 4.22: Estabilidad global de la cápsida del bacteriófago T7.** En todos los casos la temperatura del tratamiento fue de 37 °C.

Con estos ensayos se determinó como las diferentes concentraciones de urea y GuHCl influyen en la estabilidad de las precabezas o de las cabezas sin ADN. El efecto de los dos agentes desnaturalizantes es dramáticamente diferente en las dos estructuras analizadas. Los resultados muestran que el tratamiento con 3M urea produce la rotura de las precabezas y estas llegan a ser completamente desnaturalizadas en concentraciones de 4M urea. Con este mismo agente y en concentraciones análogas el efecto sobre las cabezas maduras es imperceptible, ya que muestran una estructura bien preservada. En el caso de las precabezas tratadas con GuHCl es de destacar, como se observa en la [Figura 4.22](#), que hay que emplear concentraciones tres veces menores de GuHCl para obtener efectos similares a los producidos por la urea, lo que nos indica que el GuHCl tiene una capacidad desnaturalizante mayor a la urea.

Debido a la elevada estabilidad de la cápsida madura aumentamos las concentraciones de urea y GuHCl respectivamente con el objetivo de observar las condiciones de desestabilización de dichas estructuras. Nuestros análisis han determinado que una concentración de 6M urea durante 90 minutos no afecta a la integridad de la cápsida madura mientras que un tratamiento con 6M GuHCl durante 10 minutos tiene como efecto la desnaturalización total de las cápsidas ([Figura 4.23](#)). Además, para una concentración de 4M de GuHCl, se observa como en función del tiempo de reacción existe un incremento en la desestabilización de las cápsidas.



**Figura4.23: Influencia del GuHCl sobre la cápsida madura del bacteriófago T7.** En todos los casos la temperatura del tratamiento fue de 37 °C.

Estos análisis de la estabilidad ponen de manifiesto que los patrones de rotura que se dan en las cápsidas maduras son muy diferentes a los de las precabezas.

Los resultados obtenidos dan una idea general de la estabilidad de la cápsida del bacteriófagos T7 pero es necesario completar el estudio y afinar las diferentes condiciones de rotura en función del agente utilizado, la concentración del mismo y los tiempos de incubación.

## **5 Discusión**





Los bacteriófagos de ADN de cadena doble son un buen modelo para entender procesos biológicos básicos como las interacciones macromoleculares que se dan durante el ensamblaje y la maduración del virus, o el comportamiento de los motores moleculares implicados en el empaquetamiento del ADN. Entender estos mecanismos requiere conocer las interacciones que se entre las proteínas de la cápsida, de la proteína de andamiaje o de los componentes del complejo portal.

En los últimos años se han publicado estructuras tridimensionales con alta resolución obtenidas mediante criomicroscopía electrónica de virus humanos como el HSV-1 (Baker et al, 2005) o para bacteriófagos como P22 (Chen et al, 2011),  $\epsilon 15$  (Jiang et al, 2008), P-SSP7 (Liu et al, 2010), Sf6 (Parent et al, 2012), 80 $\alpha$  (Spilman et al, 2011), SPP1 (White et al, 2012), phi29 (Morais et al, 2005), lambda (Lander et al, 2008) o T7 (Agirrezabala et al, 2007); así como estructuras determinadas por cristalografía de rayos X como es el caso de HK97 (Wikoff et al, 2000) y T4 (Fokine et al, 2005). Estas estructuras han permitido esclarecer los mecanismos de interacción entre las proteínas de sus cápsidas; y su estudio comparativo apunta a un ancestro común a pesar de la variabilidad en sus secuencias (Bamford et al, 2005).

Una etapa fundamental en el proceso de formación de las partículas virales infectivas es la maduración de la cápsida, lo que implica la transición de la cápsida entre sus dos formas precabeza-cabeza. Por consiguiente, determinar con alta resolución la estructura tridimensional de los virus en diferentes estados morfogénicos permite responder a la pregunta: ¿Cuáles son los cambios conformacionales que tienen lugar en el proceso de maduración de un virus?

En el caso del bacteriófago T7 se conocía la estructura de la cápsida en su estadio de precabeza (Agirrezabala et al, 2007), lo que dejó abierta la respuesta a la pregunta anteriormente formulada.

En este trabajo se ha determinado la estructura tridimensional de la cápsida madura del bacteriófago T7 a una resolución de 0,9 nm. Para ello se emplearon técnicas de criomicroscopía electrónica y procesamiento de imágenes de muestras de virus aislados.

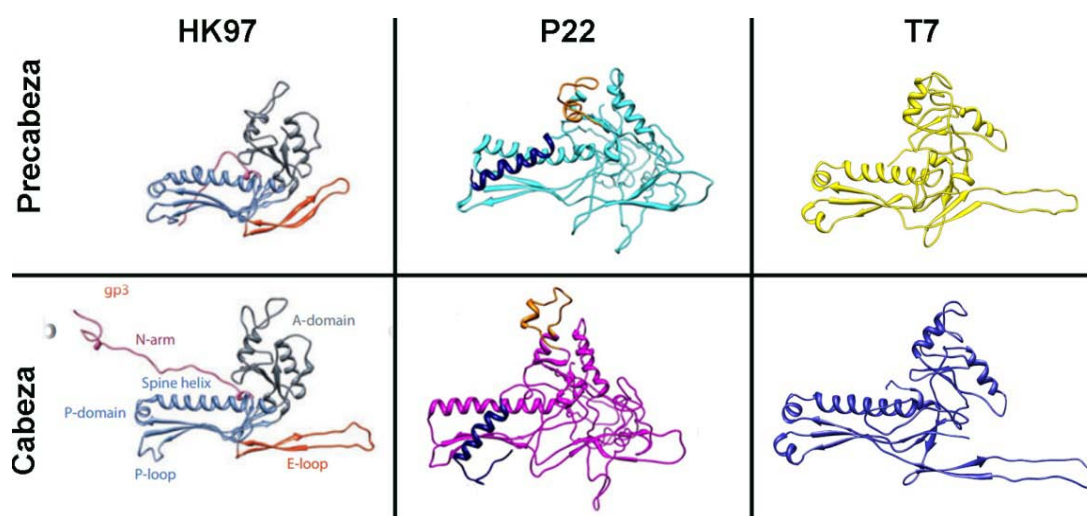
La resolución del mapa de la cápsida madura obtenido en este trabajo ha permitido segmentar la unidad asimétrica y tras un proceso de refinamiento iterativo, se obtuvo la estructura de la proteína mayoritaria de la cápsida que la compone, la gp10A. Con esos datos, y en base a la similitud en el plegamiento de las proteínas que forman la cápsida del virus T7 (gp10A) y HK97 (gp5) se generó un modelo atómico de dicha proteína gp10A, que posteriormente se ajustó en el mapa de densidad del monómero que finalmente se utilizó para obtener el modelo pseudoatómico de la cápsida completa.

La comparación entre la cápsida de la precabeza y de la cabeza madura, muestra que el fago T7 sigue el esquema general del proceso de maduración que se da en la mayoría de los fagos de ADN de cadena doble (Veesler & Johnson, 2012). El proceso de maduración muestra que la cápsida aumenta su diámetro alcanzando los 60 nm desde los 51 nm que mide en la precabeza. Simultáneamente se produce una disminución en el grosor de la cápsida hasta los 2,3 nm desde los 4,5 nm de la precabeza. Estas transformaciones son las consecuencias de los movimientos de inclinación, rotación y desplazamiento radial que experimentan los monómeros de la proteína

de la cápsida.

## 5.1 Reorganización de los dominios que forman la proteína de la cápsida

En el modelo atómico obtenido en este trabajo los dominios de la proteína de la cápsida de T7 se nombraron siguiendo la nomenclatura de la proteína de la cápsida de HK97 (Wikoff et al, 2000). En la cabeza madura la proteína presenta una inclinación relativa de  $22^\circ$  del dominio A respecto a la posición del dominio P en la precabeza. Este tipo de movimiento relativo entre los dominios A y P ha sido previamente descrito en la maduración de HK97 (Gertsman et al, 2009) y de P22 (Parent et al, 2010). El mapa de densidad correspondiente a la cápsida del virus, se ha determinado con una resolución que no es suficiente para definir si los cambios en la estructura de la proteína de la cápsida, gp10A, incluyen también giros y/o torsiones de sus propias hélices  $\alpha$  o laminas  $\beta$ , como se ha descrito recientemente para HK97 (Gertsman et al, 2009). En la maduración de la cápsida de HK97, la estructura de la proteína de la cápsida se distorsiona y la hélice  $\alpha$  del dominio P está parcialmente desestructurada e inclinada con un giro de  $35^\circ$  sobre las 3 laminas  $\beta$  del mismo dominio. También en el caso de P22 las reconstrucciones de alta resolución han permitido definir diferencias conformacionales entre la estructura del monómero de la cabeza respecto a la precabeza. En la cabeza, la hélice  $\alpha$  del dominio P está más relajada, la punta del dominio A (en naranja en la [Figura 5.1](#)) flexiona hacia los centros de los capsómeros durante la maduración y, de esta forma, los centros de los capsómeros están mas cerrados. El dominio amino terminal del monómero maduro está rotado  $20^\circ$  respecto a la precabeza y está por debajo de las laminas  $\beta$  del dominio P (Chen et al, 2011).



**Figura 5.1: Comparación entre las estructuras de la proteína de la cápsida para los bacteriófagos HK97, P22 y T7 en sus formas de la precabeza y cabeza.** Las estructuras de HK97 son reproducidas de (Veesler & Johnson, 2012) y las de P22 de (Chen et al, 2011).

Otro dominio de la proteína de la cápsida de T7 que sufre cambios muy significativos durante el proceso de maduración es el dominio amino terminal. Debido a la baja identidad entre la secuencia de este dominio y la secuencia de la proteína de la cápsida de HK97, esta región fue eliminada del modelo que se generó para la proteína de la cápsida del fago T7. Por lo tanto, no hay una localización directa de este dominio en el mapa de la cápsida reconstruida. La localización de dicha densidad fue posible debido a la generación de mapas de diferencia entre el volumen experimental y el volumen generado en base al modelo pseudoatómico tanto para la precabeza como para la cabeza madura. En la precabeza, el dominio amino terminal se atribuyó a las diferencias encontradas en la parte interna de la cápsida (Agirrezabala et al, 2007). En base a la similitud entre la localización de este dominio en la parte interna de la precabeza y al posicionamiento del dominio  $\Delta$  de HK97 en la forma I de la precabeza (Conway et al, 1995) se había propuesto que el dominio amino terminal de la proteína gp10A podría estar implicado en la interacción con la proteína de andamiaje en el proceso de ensamblaje del virus (Agirrezabala et al, 2007). En el presente trabajo se ha localizado el dominio amino terminal de la cabeza madura en la superficie externa de la cápsida. Las cápsidas virales son estructuras dinámicas y este tipo de transición en la región amino terminal desde el interior hacia el exterior de la cápsida se había descrito previamente en el proceso de maduración de otros virus, como poliovirus (Belnap et al, 2000) o incluso en el bacteriófago T4 (Steven et al, 1991). Un dominio similar que interacciona con la proteína de andamiaje que cambia su posición interna fue descrito en P22 (Jiang et al, 2003). De esta forma, el dominio amino terminal podría jugar un papel de conmutador del comienzo del proceso de maduración. Mientras dicho dominio se encuentra en el interior de la cápsida y está conectado con la proteína de andamiaje evitaría una maduración temprana. Pero una vez que se inicia el empaquetamiento del ADN, la proteína de andamiaje empieza a desensamblarse, se rompe la interacción con el dominio amino terminal y la precabeza comienza su proceso de maduración; las subunidades proteicas que forman la cápsida se reorganizan y el dominio amino terminal se desplaza hacia el exterior de la cápsida. Este movimiento del dominio amino terminal desde el interior hacia el exterior de la cápsida podría representar un seguro de transición unidireccional, evitándose pasos atrás en el proceso de maduración. La unidireccionalidad del proceso de maduración en el caso del fago HK97 viene dada por la proteólisis del dominio  $\Delta$ , ya que la presencia de este dominio evita una expansión prematura de la precabeza (Ross et al, 2006).

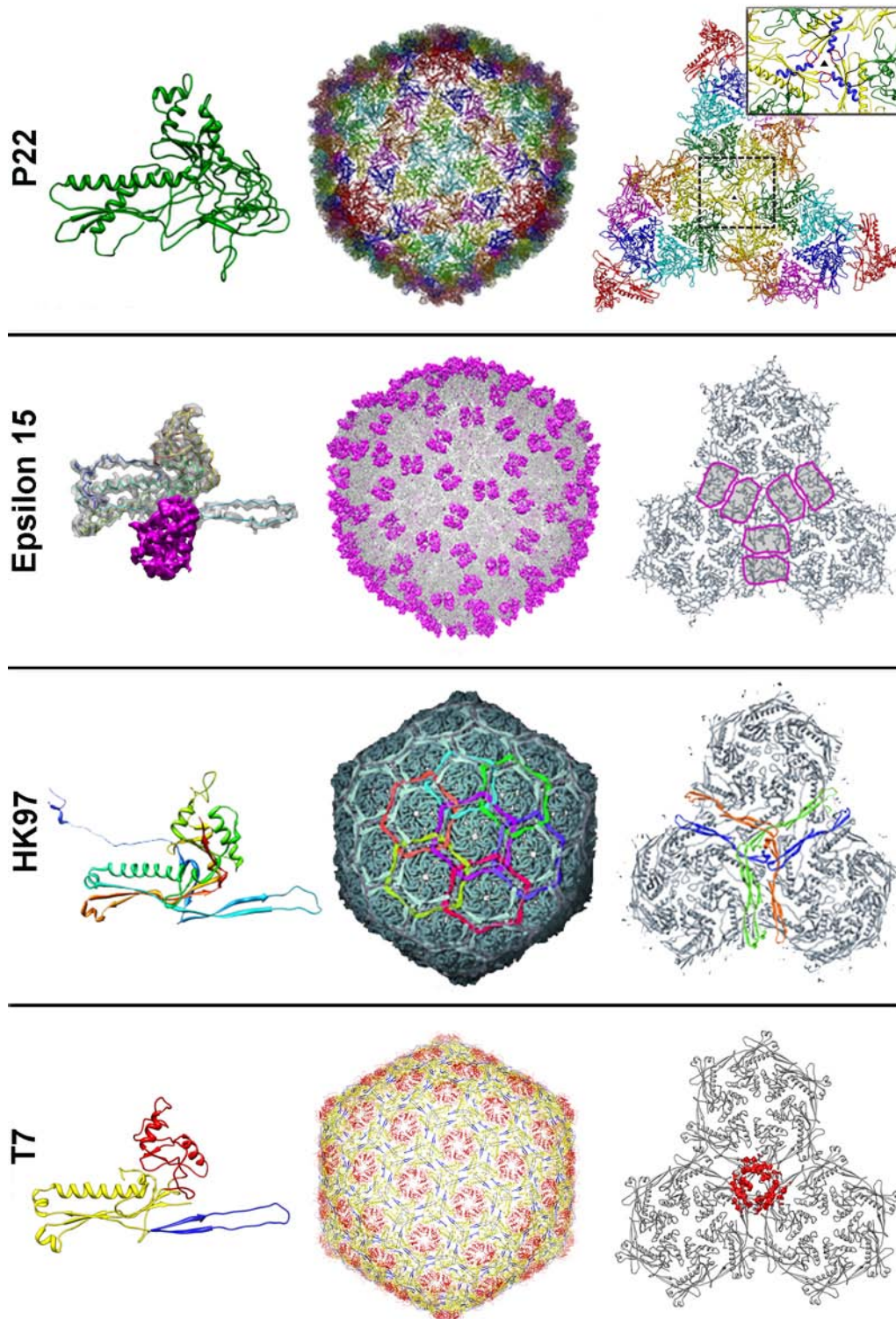
## 5.2 Mecanismo de estabilización de la cápsida en el proceso de maduración del bacteriófago T7

La transición precabeza-cabeza madura está acompañada en el bacteriófago T7 de una compleja reorganización de las subunidades, teniendo como consecuencia un aumento de las interacciones. La reorganización se produce a todos los niveles estructurales. Hay reorganización en la proteína de la cápsida, a través de la inclinación del dominio A respecto del dominio P, un movimiento del amino terminal hacia el exterior o la curvatura del lazo E. En los

capsómeros se observa un incremento del radio y en el caso del hexón también una simetrización del mismo. Además, dependiendo de su posición en el pentámero o hexámero, los monómeros sufren translaciones, rotaciones en plano e inclinaciones con diferentes ángulos. El resultado es una cápsida expandida, con paredes más finas, en la cual hay un aumento de las interacciones entre subunidades. No obstante, y a pesar de estos cambios hay ciertas conformaciones que están conservadas durante la maduración; por ejemplo se conservan la topología de los contactos en los ejes de simetría 3 y cuasi 3. Esto es debido a que se mantienen las interacciones que se dan entre los dominios P/lazos P de subunidades vecinas. Además los contactos en los ejes de simetría 3 se ven reforzados por la presencia de los lazos E. Como se ha descrito en el capítulo Resultados, parte de la zona de diferencia que se ha detectado en la superficie de la cápsida fue atribuida al dominio lazo E de la proteína de la cápsida (Figura 4.18). En la precabeza se habían identificado tres zonas de diferencias alrededor de los ejes de simetría 3, zonas que no tenían correspondencia en el modelo pseudoatómico de la cápsida (Agirrezabala et al, 2007). Debido al tamaño, forma y localización en el conjunto de la cápsida se sugirió que estas zonas podrían corresponder al dominio lazo E, hipotetizando que estos dominios podrían estar implicados en la estabilización de la cápsida de la precabeza. Nuestros resultados confirmarían esta hipótesis; los dominios lazo E de una subunidad se superponen con el dominio P de la subunidad adyacente tanto en la precabeza como en la cabeza, formando alrededor de los ejes de simetría 3 una red de contactos que se conservan su topología en el proceso de maduración aumentando considerablemente las áreas de interacción. Los residuos de estas zonas son principalmente polares al igual que en el bacteriófago HK97 (Helgstrand et al, 2003). El patrón de las interacciones alrededor de los ejes de simetría 3, implicando el lazo E, se ha descrito también en HK97 donde se ha propuesto que los ejes 3 actuarían de bisagra asegurando la integridad de la cápsida (Gertsman et al, 2009). Nuestros resultados indican que es probable que éste sea también el caso del bacteriófago T7.

### 5.3 Mecanismos generales de estabilización de las cápsidas virales

El proceso de maduración implica importantes cambios estructurales que tienen lugar siempre sin romper la integridad de la partícula. El efecto principal es la estabilización de la cápsida, lo que le permite resistir la alta presión inducida por el empaquetamiento del ADN y llevar a cabo su función, que es proteger el genoma viral y asegurar la infectividad. A pesar de que las proteínas que forman sus cápsidas tienen estructuras similares, los bacteriófagos de ADN de cadena doble han desarrollado diferentes mecanismos para estabilizar estas cápsidas. Los diferentes mecanismos se ven resumidos en la Figura 5.2 y se detallan a continuación.



**Figura 5.2: Mecanismos de estabilización de las cápsidas virales.** Para cada uno de los bacteriófagos está representado a la izquierda el modelo atómico de la proteína de la cápsida madura, en el centro el modelo de la cápsida completa y, a la derecha la estabilización de la cápsida en el eje 3 de simetría. **P22** – La proteína de la cápsida está representada en verde (PDB ID: 2XYZ). El recuadro muestra el detalle del eje de simetría 3. Las imágenes están adaptadas de (Chen et al, 2011); **Epsilon15** – La proteína de la cápsida está representada en gris (PDB ID: 3C5B) y la proteína accesoria en magenta (Lander et al, 2008); **HK97** – La proteína de la cápsida (PDB ID: 1OHG). La representación de la cápsida completa muestra la complejidad en la red de interacciones que estabilizan la cápsida. **T7** – Los dominios de proteína de la cápsida están coloreados siguiendo el código de colores utilizados en esta tesis: en rojo el dominio A, en amarillo el dominio P y en azul el lazo E. En la figura de la derecha, las zonas de interacciones en el eje de simetría 3 están representadas en rojo;

Uno de los mecanismos de estabilización de la cápsida implica nuevas interacciones entre subunidades vecinas a través de un dominio adicional que es parte integrante de la estructura primaria de la cápsida. Esto ocurre en bacteriófagos como P22 (Chen et al, 2011) o Phi29 (Morais et al, 2005) cuyas proteínas de la cápsida son más largas que la proteína de HK97 en aproximadamente 150 residuos. Estos dominios adicionales, llamados ED (“extra-density”) en P22 y BIG2 (“bacterialimmunoglobulin”) se encuentran por encima del lazo E formando contactos intercapsoméricos (e intracapsoméricos en el caso de P22) y de esta manera estabilizando la cápsida.

El mecanismo de estabilización más común es la incorporación de proteínas accesorias que forman contactos adicionales, reforzando de esta manera los propios contactos de la cápsida icosaédrica. Estas proteínas se incorporan una vez que los monómeros que forman la cápsida de la precabeza se reorganizan y exponen regiones enterradas, evitando de esta manera asociaciones tempranas entre estas proteínas y la cápsida, que darían lugar a cápsidas abortivas. Este caso se da en virus como HSV-1 (Trus et al, 1996), adenovirus (Saban et al, 2006) o en bacteriófagos como lambda (Yang et al, 2000), T4 (Fokine et al, 2004) o epsilon15 (Jiang et al, 2008). El bacteriófago T4 tiene dos proteínas accesorias, Soc y Hoc. Las moléculas de Hoc se unen en los centros de los hexámeros y tienen sólo un efecto mínimo en la estabilización de la cápsida, mientras que las moléculas de Soc, se unen entre hexámeros adyacentes y ayudan a estabilizar la cápsida en condiciones de altas temperaturas y pH extremos (Qin et al, 2010). En el caso del bacteriófago lambda, la proteína accesoria gpD se une en los ejes 3 de simetría y en su ausencia los virus no pueden empaquetar todo el genoma, ya que la presión que genera un 90% de genoma empaquetado haría estallar la cápsida (Lander et al, 2008).

Existe un tercer mecanismo de estabilización de la cápsida durante el proceso de maduración, que se ha descrito sólo en el bacteriófago HK97. Durante la expansión de este fago los cambios conformacionales favorecen la formación de enlaces covalentes, tipo “cross-linking” (entrecruzamiento) entre la Lys169 del dominio lazo E de una subunidad y el Asn356 del dominio P de la subunidad adyacente, formando una red de interacciones en toda la cápsida (Conway et al, 2001). Además, las interacciones intercapsoméricas que se dan en el lazo del dominio P en los ejes de simetría de orden 3, se conservan durante la maduración ayudando a estabilizar la cápsida (Gertsman et al, 2009). Los efectos del “cross-linking” en la estabilidad de la cápsida fueron estudiados por calorimetría diferencial (Ross et al, 2005), mostrando que la expansión de HK97 en si (a diferencia de T4 o P22) implica una ligera desestabilización que está después corregida con la formación de estos enlaces covalentes (Steven et al, 2005).

En este trabajo hemos visto que la maduración del bacteriófago T7 es muy similar al de HK97 pero la estabilización de su cápsida no requiere elementos complementarios como la formación de enlaces covalentes, de nuevas proteínas o dominios adicionales. En un artículo publicado durante la realización de la parte final de esta tesis se mostraron resultados muy similares a las observaciones aquí descritas pero en el bacteriófago P-SSP7, que tiene semejanzas con la familia de T7 (Liu et al, 2010). Estos autores han resuelto la estructura de la cápsida madura del virus a una resolución de 0,46 nm y describen que emplea sólo interacciones intracapsoméricas e intercapsoméricas para estabilizar la estructura. Así, se



muestra que el dominio amino terminal de una subunidad envuelve el lazo E de la subunidad adyacente, reduciendo de esta forma la flexibilidad de dicho lazo (Liu et al, 2010).

En el caso de los bacteriófagos descritos anteriormente y también en otros como 80 (Spilman et al, 2011) o Sf6 (Parent et al, 2012) se han definido contactos extensos en los ejes de simetría 3 entre las proteínas que forman sus cápsidas, lo que implica que esta es una característica conservada entre los bacteriófagos de ADN de cadena doble.

Nuestros resultados indican que la maduración del bacteriófago T7 se asemeja a la del fago HK97 más que a la de P22. Debido a que en su proceso de maduración el bacteriófago T7 no requiere la presencia de proteínas o dominios adicionales, se puede proponer que podría ser un sistema básico en la línea evolutiva en cuanto a sus mecanismos de estabilización de la cápsida en el proceso de maduración. A partir de este sistema básico se pueden generar otras soluciones más complejas, mediante la incorporación de nuevos dominios en la proteína de la cápsida que refuerzan las interacciones intermonoméricas, o la incorporación de proteínas adicionales para reforzar la red de contactos básicos. El caso del fago HK97 podría representar un escalón muy peculiar en la evolución mediante la incorporación de la generación de enlaces covalentes que dan lugar a una “supercápsida”. No obstante, y a pesar de la aparente idoneidad de este mecanismo para generar un reforzamiento masivo en la cápsida viral, el hecho de que solo se encuentre en HK97 puede sugerir que no representa una ventaja evolutiva evidente en términos generales.

La estructura de la cápsida, y la reorganización intermolecular involucrada en el proceso de maduración, sirven de base conceptual para tratar de entender las propiedades mecánicas y la estabilidad global de las cápsidas virales en sus diferentes estadios conformacionales. Las propiedades mecánicas de las cápsidas virales son fundamentales para su correcto funcionamiento ya que su rotura tiene como consecuencia la pérdida de la infectividad del virus. La rotura de las cápsidas implica la rotura de las interacciones que se dan dentro de los capsómeros y entre capsómeros.

En la literatura encontramos diferentes métodos para estudiar las propiedades mecánicas de las cápsidas virales. Además de los experimentos de microscopía de fuerzas atómicas, se pueden realizar estudios de roturas de las cápsidas usando diferentes agentes químicos, choques osmóticos o tratamientos térmicos monitorizados por calorimetría diferencial de barrido o fluorescencia. Los tratamientos térmicos sobre las precabezas de P22 provocan la expulsión de los pentámeros después de 15 minutos a 70°C, lo que sugiere la rotura de las interacciones pentón-hexón (Teschke et al, 2003). En el caso de las partículas infectivas de SPP1 se ha visto que liberan el ADN a temperaturas de 71°C y se desestabilizan a 75°C, lo que muestra que la infectividad y la estabilidad de las partículas tienen una dependencia similar con la temperatura (White et al, 2012). Esta situación es muy diferente en el bacteriófago HK97 donde experimentos de calorimetría han demostrado que el virus pierde su ADN a 50°C pero su cápsida se mantiene estable hasta temperaturas de 90°C (Duda et al, 2009).

Para analizar las propiedades mecánicas de la cápsida del bacteriófago T7 hemos realizado experimentos basados en la influencia de agentes químicos como urea o GuHCl sobre la precabeza y la cabeza madura. Los resultados de los tratamientos con distintas concentraciones de urea y GuHCl confirman una mayor estabilidad de la cabeza madura frente a la precabeza independientemente del agente químico utilizado. Esto sugiere una mayor presencia de interacciones, tanto iónicas como hidrófobas, en las cabezas maduras respecto a las precabezas. Este resultado concuerda con los cambios estructurales que tienen lugar durante la maduración del fago T7 y descritos también en este trabajo. El aumento del área de interacción entre monómeros podría estar reforzando el efecto estabilizador de las regiones iónicas e hidrófobas de la cápsida viral. Además, este comportamiento en la diferencia de estabilidad está en concordancia con el hecho de que la precabeza es una forma metaestable sujeta a transformaciones posteriores mientras que la cabeza madura representa un estadio final del proceso de ensamblaje viral.

Las propiedades mecánicas a escala nanométrica se pueden estudiar mediante experimentos de indentación usando microscopía de fuerzas atómicas. Este método consiste esencialmente en someter a deformación controlada un material cuyas propiedades mecánicas, como el módulo de elasticidad y la dureza, se pretenden conocer. Experimentos de indentación del bacteriófago HK97 demuestran que durante la maduración de la cápsida viral hay un aumento tanto del módulo de Young como de la fuerza de rotura (Roos et al, 2012). Los resultados de HK97 indican que el aumento del valor del módulo de Young entre precabeza y cabeza se debe al proceso de maduración en conjunto (reorganización topológica de las subunidades, cambios en la estructura terciaria de la proteína de la cápsida, etc.) y no específicamente a la formación de los enlaces covalentes que se dan entre las subunidades de la cápsida madura. Si analizamos las propiedades mecánicas de los bacteriófagos HK97 (Roos et al, 2012) y lambda (Ivanovska et al, 2007), observamos que los dos tienen valores comparables para el módulo de Young, pero los valores de indentación a la rotura presentan diferencias significativas, siendo más altos en las cápsidas de HK97, pudiéndose de este modo concluir que el fago HK97 tiene una cápsida más robusta que lambda. Esto se debe a los diferentes mecanismos que estabilizan las cápsidas de los dos fagos, la formación de los enlaces covalentes en HK97 (Conway et al, 2001) y la presencia de la proteína accesoria gpD en el caso de lambda (Lander et al, 2008). Otro virus que presenta valores comparables del módulo de Young es HSV-1 (Roos et al, 2009). Estos autores sugieren que la cápsida de HSV-1 se estabiliza después de la eliminación de la proteína de andamiaje, y que esta estabilización está inducida por el empaquetamiento del ADN, pero de forma independiente de su presencia, ya que los experimentos de indentación dan valores similares para las cápsidas con y sin ADN. Por el contrario, en el caso del virus MVM (Minute Virus of Mice) (Carrasco et al, 2006) o el bacteriófago lambda (Ivanovska et al, 2007) los estudios han demostrado que el empaquetamiento del ADN aumenta la dureza mecánica de las cápsidas.

El mecanismo de empaquetamiento del genoma puede influir en las propiedades elásticas de las cápsidas virales. Se ha demostrado en el caso de los virus que se autoensamblan



integrando su genoma, como es el caso del virus CCMV o el virus HBV (Hepatitis B Virus), las propiedades elásticas son unas tres veces menores que la de los virus que usan un motor molecular para empaquetar su ADN, lo que se traduce en unas cápsidas más resistentes en estos últimos (Roos et al, 2012).

En el caso del bacteriófago phi29, estudios de estabilidad mediante pruebas de indentación han revelado que las líneas de rotura de las cápsidas virales coinciden con los bordes de los trímeros formados por la proteína de la cápsida gp8, y se ha propuesto que estos trímeros podrían ser los elementos más estables de la cápsida (Ivanovska et al, 2011).

Nuestro grupo está trabajando en colaboración con el Dr. Pedro de Pablo en el estudio de las propiedades nanomecánicas del bacteriófago T7. Estos datos permitirán comparar el comportamiento mecánico de T7 con el de los otros virus estudiados, lo que dará información sobre las bases moleculares de la estabilización diferencial entre los distintos tipos de cápsidas, toda vez que los mecanismos de estabilización de sus cápsidas son diferentes. Además se podría analizar el papel diferencial de trímeros, pentámeros y hexámeros en las características mecánicas y en la estabilidad de las cápsidas.

El conjunto de datos obtenidos mediante técnicas como la microscopia electrónica, calorimetría diferencial y microscopía de fuerzas atómicas permitirán en un futuro próximo entender las bases moleculares del proceso de maduración de las cápsidas virales y en particular la del bacteriófago T7.



## **6 Conclusiones**



## Conclusiones

1. La maduración de la precabeza implica cambios en la topología de los dominios que forman la proteína de la cápsida, gp10A.
2. La expansión de la cápsida se debe a los movimientos de inclinación, rotación y translación radial que experimentan los monómeros de gp10A, así como al establecimiento de una nueva red de contactos intercapsoméricos.
3. El proceso de maduración genera un incremento en las superficies de contacto entre las subunidades de la cabeza respecto a las de la precabeza.
4. El reforzamiento de las interacciones intra e intercapsoméricas durante la maduración de T7 no implica la presencia de dominios o proteínas adicionales para estabilizar su cápsida.



## **7 Bibliografía**





- Ackermann HW (2003) Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol* **154**: 245-251
- Ackermann HW (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of virology* **152**: 227-243
- Agirrezabala X, Martin-Benito J, Caston JR, Miranda R, Valpuesta JM, Carrascosa JL (2005a) Maturation of phage T7 involves structural modification of both shell and inner core components. *The EMBO journal* **24**: 3820-3829
- Agirrezabala X, Martin-Benito J, Valle M, Gonzalez JM, Valencia A, Valpuesta JM, Carrascosa JL (2005b) Structure of the connector of bacteriophage T7 at 8Å resolution: structural homologies of a basic component of a DNA translocating machinery. *Journal of molecular biology* **347**: 895-902
- Agirrezabala X, Velazquez-Muriel JA, Gomez-Puertas P, Scheres SH, Carazo JM, Carrascosa JL (2007) Quasi-atomic model of bacteriophage t7 procapsid shell: insights into the structure and evolution of a basic fold. *Structure* **15**: 461-472
- Aksyuk AA, Rossmann MG (2011) Bacteriophage assembly. *Viruses* **3**: 172-203
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**: 3389-3402
- Baker ML, Jiang W, Rixon FJ, Chiu W (2005) Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages. *Journal of virology* **79**: 14967-14970
- Baker ML, Ju T, Chiu W (2007) Identification of secondary structure elements in intermediate-resolution density maps. *Structure* **15**: 7-19
- Baker TS, Olson NH, Fuller SD (1999) Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 862-922, table of contents
- Bamford DH (2003) Do viruses form lineages across different domains of life? *Res Microbiol* **154**: 231-236
- Bamford DH, Grimes JM, Stuart DI (2005) What does structure tell us about virus evolution? *Curr Opin Struct Biol* **15**: 655-663
- Belnap DM, Filman DJ, Trus BL, Cheng N, Booy FP, Conway JF, Curry S, Hiremath CN, Tsang SK, Steven AC, Hogle JM (2000) Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *Journal of virology* **74**: 1342-1354

- Brussow H, Hendrix RW (2002) Phage genomics: small is beautiful. *Cell* **108**: 13-16
- Canady MA, Tihova M, Hanzlik TN, Johnson JE, Yeager M (2000) Large conformational changes in the maturation of a simple RNA virus, nudaurelia capensis omega virus (NomegaV). *Journal of molecular biology* **299**: 573-584
- Carrasco C, Carreira A, Schaap IA, Serena PA, Gomez-Herrero J, Mateu MG, de Pablo PJ (2006) DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 13706-13711
- Carrasco C, Douas M, Miranda R, Castellanos M, Serena PA, Carrascosa JL, Mateu MG, Marques MI, de Pablo PJ (2009) The capillarity of nanometric water menisci confined inside closed-geometry viral cages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 5475-5480
- Caspar DL, Klug A (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **27**: 1-24
- Cerritelli ME, Conway JF, Cheng N, Trus BL, Steven AC (2003) Molecular mechanisms in bacteriophage T7 procapsid assembly, maturation, and DNA containment. *Adv Protein Chem* **64**: 301-323
- Cerritelli ME, Studier FW (1996) Assembly of T7 capsids from independently expressed and purified head protein and scaffolding protein. *Journal of molecular biology* **258**: 286-298
- Condrón BG, Atkins JF, Gesteland RF (1991a) Frameshifting in gene 10 of bacteriophage T7. *J Bacteriol* **173**: 6998-7003
- Condrón BG, Gesteland RF, Atkins JF (1991b) An analysis of sequences stimulating frameshifting in the decoding of gene 10 of bacteriophage T7. *Nucleic acids research* **19**: 5607-5612
- Conway JF, Duda RL, Cheng N, Hendrix RW, Steven AC (1995) Proteolytic and conformational control of virus capsid maturation: the bacteriophage HK97 system. *Journal of molecular biology* **253**: 86-99
- Conway JF, Wikoff WR, Cheng N, Duda RL, Hendrix RW, Johnson JE, Steven AC (2001) Virus maturation involving large subunit rotations and local refolding. *Science* **292**: 744-748
- Cuervo A, Carrascosa JL (2011) Viral connectors for DNA encapsulation. *Current opinion in biotechnology*
- Chang J, Liu X, Rochat RH, Baker ML, Chiu W (2012) Reconstructing virus structures from nanometer to near-atomic resolutions with cryo-electron microscopy and tomography. *Advances in experimental medicine and biology* **726**: 49-90
- Chang J, Weigele P, King J, Chiu W, Jiang W (2006) Cryo-EM asymmetric reconstruction of bacteriophage P22 reveals organization of its DNA packaging and

infecting machinery. *Structure* **14**: 1073-1082

Chen DH, Baker ML, Hryc CF, DiMaio F, Jakana J, Wu W, Dougherty M, Haase-Pettingell C, Schmid MF, Jiang W, Baker D, King JA, Chiu W (2011) Structural basis for scaffolding-mediated assembly and maturation of a dsDNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 1355-1360

Choi KH, Morais MC, Anderson DL, Rossmann MG (2006) Determinants of bacteriophage phi29 head morphology. *Structure* **14**: 1723-1727

Dokland T (1999) Scaffolding proteins and their role in viral assembly. *Cell Mol Life Sci* **56**: 580-603

Dokland T, Wang S, Lindqvist BH (2002) The structure of P4 procapsids produced by coexpression of capsid and external scaffolding proteins. *Virology* **298**: 224-231

Duda RL, Hempel J, Michel H, Shabanowitz J, Hunt D, Hendrix RW (1995a) Structural transitions during bacteriophage HK97 head assembly. *Journal of molecular biology* **247**: 618-635

Duda RL, Martincic K, Hendrix RW (1995b) Genetic basis of bacteriophage HK97 prohead assembly. *Journal of molecular biology* **247**: 636-647

Duda RL, Ross PD, Cheng N, Firek BA, Hendrix RW, Conway JF, Steven AC (2009) Structure and energetics of encapsidated DNA in bacteriophage HK97 studied by scanning calorimetry and cryo-electron microscopy. *Journal of molecular biology* **391**: 471-483

England JL, Haran G (2011) Role of solvation effects in protein denaturation: from thermodynamics to single molecules and back. *Annu Rev Phys Chem* **62**: 257-277

Fan YX, McPhie P, Miles EW (1999) Guanidine hydrochloride exerts dual effects on the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 complex as a cation activator and as a modulator of the active site conformation. *Biochemistry* **38**: 7881-7890

Fane BA, Prevelige PE, Jr. (2003) Mechanism of scaffolding-assisted viral assembly. *Adv Protein Chem* **64**: 259-299

Fernandez JJ, Luque D, Caston JR, Carrascosa JL (2008) Sharpening high resolution information in single particle electron cryomicroscopy. *Journal of structural biology* **164**: 170-175

Fokine A, Chipman PR, Leiman PG, Mesyanzhinov VV, Rao VB, Rossmann MG (2004) Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6003-6008

Fokine A, Leiman PG, Shneider MM, Ahvazi B, Boeshans KM, Steven AC, Black LW, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG (2005) Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97 point to a common ancestry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:

Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadj M, Leith A (1996) SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *Journal of structural biology* **116**: 190-199

Freifelder D (1966) Effect of NaClO<sub>4</sub> on bacteriophage: release of DNA and evidence for population heterogeneity. *Virology* **28**: 742-750

Fujisawa H, Morita M (1997) Phage DNA packaging. *Genes Cells* **2**: 537-545

Ganser BK, Li S, Klishko VY, Finch JT, Sundquist WI (1999) Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science* **283**: 80-83

Garcia LR, Molineux IJ (1996) Transcription-independent DNA translocation of bacteriophage T7 DNA into Escherichia coli. *J Bacteriol* **178**: 6921-6929

Gertsman I, Gan L, Guttman M, Lee K, Speir JA, Duda RL, Hendrix RW, Komives EA, Johnson JE (2009) An unexpected twist in viral capsid maturation. *Nature* **458**: 646-650

Helgstrand C, Wikoff WR, Duda RL, Hendrix RW, Johnson JE, Liljas L (2003) The refined structure of a protein catenane: the HK97 bacteriophage capsid at 3.44 Å resolution. *Journal of molecular biology* **334**: 885-899

Hendrix RW (1978) Symmetry mismatch and DNA packaging in large bacteriophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 4779-4783

Heymann JB, Belnap DM (2007) Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy. *Journal of structural biology* **157**: 3-18

Huet A, Conway JF, Letellier L, Boulanger P (2010) In vitro assembly of the T=13 procapsid of bacteriophage T5 with its scaffolding domain. *Journal of virology* **84**: 9350-9358

Ivanovska I, Wuite G, Jonsson B, Evilevitch A (2007) Internal DNA pressure modifies stability of WT phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 9603-9608

Ivanovska IL, de Pablo PJ, Ibarra B, Sgalari G, MacKintosh FC, Carrascosa JL, Schmidt CF, Wuite GJ (2004) Bacteriophage capsids: tough nanoshells with complex elastic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 7600-7605

Ivanovska IL, Miranda R, Carrascosa JL, Wuite GJ, Schmidt CF (2011) Discrete fracture patterns of virus shells reveal mechanical building blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 12611-12616

Jiang W, Baker ML, Jakana J, Weigele PR, King J, Chiu W (2008) Backbone structure of the infectious epsilon15 virus capsid revealed by electron cryomicroscopy. *Nature*

**451:** 1130-1134

Jiang W, Chang J, Jakana J, Weigele P, King J, Chiu W (2006) Structure of epsilon15 bacteriophage reveals genome organization and DNA packaging/injection apparatus. *Nature* **439**: 612-616

Jiang W, Li Z, Zhang Z, Baker ML, Prevelige PE, Jr., Chiu W (2003) Coat protein fold and maturation transition of bacteriophage P22 seen at subnanometer resolutions. *Nat Struct Biol* **10**: 131-135

Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of molecular biology* **372**: 774-797

Lander GC, Evilevitch A, Jeembaeva M, Potter CS, Carragher B, Johnson JE (2008) Bacteriophage lambda stabilization by auxiliary protein gpD: timing, location, and mechanism of attachment determined by cryo-EM. *Structure* **16**: 1399-1406

Liu CM, Jin Q, Sutton A, Chen L (2005) A novel fluorescent probe: europium complex hybridized T7 phage. *Bioconjug Chem* **16**: 1054-1057

Liu X, Zhang Q, Murata K, Baker ML, Sullivan MB, Fu C, Dougherty MT, Schmid MF, Osburne MS, Chisholm SW, Chiu W (2010) Structural changes in a marine podovirus associated with release of its genome into *Prochlorococcus*. *Nature structural & molecular biology* **17**: 830-836

Luque D, Gonzalez JM, Garriga D, Ghabrial SA, Havens WM, Trus B, Verdaguer N, Carrascosa JL, Caston JR (2010) The T=1 capsid protein of *Penicillium chrysogenum* virus is formed by a repeated helix-rich core indicative of gene duplication. *Journal of virology* **84**: 7256-7266

Lurz R, Orlova EV, Gunther D, Dube P, Droge A, Weise F, van Heel M, Tavares P (2001) Structural organisation of the head-to-tail interface of a bacterial virus. *Journal of molecular biology* **310**: 1027-1037

Matsuo-Kato H, Fujisawa H, Minagawa T (1981) Structure and assembly of bacteriophage T3 tails. *Virology* **109**: 157-164

McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**: 404-405

Mindell JA, Grigorieff N (2003) Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *Journal of structural biology* **142**: 334-347

Molineux IJ (2001) No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Mol Microbiol* **40**: 1-8

Morais MC, Choi KH, Koti JS, Chipman PR, Anderson DL, Rossmann MG (2005) Conservation of the capsid structure in tailed dsDNA bacteriophages: the pseudoatomic structure of phi29. *Mol Cell* **18**: 149-159

Morais MC, Kanamaru S, Badasso MO, Koti JS, Owen BA, McMurray CT, Anderson DL, Rossmann MG (2003) Bacteriophage phi29 scaffolding protein gp7 before and after prohead assembly. *Nat Struct Biol* **10**: 572-576

Murshudov GN, Vagin AA, Lebedev A, Wilson KS, Dodson EJ (1999) Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **55**: 247-255

Nakasu S, Fujisawa H, Minagawa T (1985) Purification and characterization of gene 8 product of bacteriophage T3. *Virology* **143**: 422-434

Navaza J, Lepault J, Rey FA, Alvarez-Rua C, Borge J (2002) On the fitting of model electron densities into EM reconstructions: a reciprocal-space formulation. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **58**: 1820-1825

Parent KN, Gilcrease EB, Casjens SR, Baker TS (2012) Structural evolution of the P22-like phages: comparison of Sf6 and P22 procapsid and virion architectures. *Virology* **427**: 177-188

Parent KN, Khayat R, Tu LH, Suhanovsky MM, Cortines JR, Teschke CM, Johnson JE, Baker TS (2010) P22 coat protein structures reveal a novel mechanism for capsid maturation: stability without auxiliary proteins or chemical crosslinks. *Structure* **18**: 390-401

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**: 1605-1612

Poranen MM, Daugelavicius R, Bamford DH (2002) Common principles in viral entry. *Annu Rev Microbiol* **56**: 521-538

Potterton E, Briggs P, Turkenburg M, Dodson E (2003) A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **59**: 1131-1137

Prasad BV, Prevelige PE, Marietta E, Chen RO, Thomas D, King J, Chiu W (1993) Three-dimensional transformation of capsids associated with genome packaging in a bacterial virus. *Journal of molecular biology* **231**: 65-74

Prasad BV, Schmid MF (2012) Principles of virus structural organization. *Adv Exp Med Biol* **726**: 17-47

Qimron U, Marintcheva B, Tabor S, Richardson CC (2006) Genomewide screens for Escherichia coli genes affecting growth of T7 bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 19039-19044

Qin L, Fokine A, O'Donnell E, Rao VB, Rossmann MG (2010) Structure of the small outer capsid protein, Soc: a clamp for stabilizing capsids of T4-like phages. *Journal of molecular biology* **395**: 728-741



- Ray K, Oram M, Ma J, Black LW (2009) Portal control of viral prohead expansion and DNA packaging. *Virology* **391**: 44-50
- Reddy VS, Johnson JE (2005) Structure-derived insights into virus assembly. *Adv Virus Res* **64**: 45-68
- Roeder GS, Sadowski PD (1977) Bacteriophage T7 morphogenesis: phage-related particles in cells infected with wild-type and mutant T7 phage. *Virology* **76**: 263-285
- Roos WH, Gertsman I, May ER, Brooks CL, 3rd, Johnson JE, Wuite GJ (2012) Mechanics of bacteriophage maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 2342-2347
- Roos WH, Radtke K, Kniesmeijer E, Geertsema H, Sodeik B, Wuite GJ (2009) Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9673-9678
- Rosenthal PB, Henderson R (2003) Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. *Journal of molecular biology* **333**: 721-745
- Ross PD, Conway JF, Cheng N, Dierkes L, Firek BA, Hendrix RW, Steven AC, Duda RL (2006) A free energy cascade with locks drives assembly and maturation of bacteriophage HK97 capsid. *Journal of molecular biology* **364**: 512-525
- Ross PD, Cheng N, Conway JF, Firek BA, Hendrix RW, Duda RL, Steven AC (2005) Crosslinking renders bacteriophage HK97 capsid maturation irreversible and effects an essential stabilization. *The EMBO journal* **24**: 1352-1363
- Rossmann MG, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Leiman PG (2004) The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 171-180
- Saban SD, Silvestry M, Nemerow GR, Stewart PL (2006) Visualization of alpha-helices in a 6-angstrom resolution cryoelectron microscopy structure of adenovirus allows refinement of capsid protein assignments. *Journal of virology* **80**: 12049-12059
- Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of molecular biology* **234**: 779-815
- Scheres SH, Nunez-Ramirez R, Sorzano CO, Carazo JM, Marabini R (2008) Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP. *Nat Protoc* **3**: 977-990
- Serwer P (1976) Internal proteins of bacteriophage T7. *Journal of molecular biology* **107**: 271-291
- Shibata H, Fujisawa H, Minagawa T (1987a) Characterization of the bacteriophage T3 DNA packaging reaction in vitro in a defined system. *Journal of molecular biology* **196**: 845-851

Shibata H, Fujisawa H, Minagawa T (1987b) Early events in DNA packaging in a defined in vitro system of bacteriophage T3. *Virology* **159**: 250-258

Sorzano CO, Marabini R, Velazquez-Muriel J, Bilbao-Castro JR, Scheres SH, Carazo JM, Pascual-Montano A (2004) XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *Journal of structural biology* **148**: 194-204

Spilman MS, Dearborn AD, Chang JR, Damle PK, Christie GE, Dokland T (2011) A conformational switch involved in maturation of Staphylococcus aureus bacteriophage 80alpha capsids. *Journal of molecular biology* **405**: 863-876

Steven AC, Bauer AC, Bisher ME, Robey FA, Black LW (1991) The maturation-dependent conformational change of phage T4 capsid involves the translocation of specific epitopes between the inner and the outer capsid surfaces. *Journal of structural biology* **106**: 221-236

Steven AC, Heymann JB, Cheng N, Trus BL, Conway JF (2005) Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol* **15**: 227-236

Steven AC, Trus BL, Maizel JV, Unser M, Parry DA, Wall JS, Hainfeld JF, Studier FW (1988) Molecular substructure of a viral receptor-recognition protein. The gp17 tail-fiber of bacteriophage T7. *Journal of molecular biology* **200**: 351-365

Tang L, Marion WR, Cingolani G, Prevelige PE, Johnson JE (2005) Three-dimensional structure of the bacteriophage P22 tail machine. *The EMBO journal* **24**: 2087-2095

Tao Y, Olson NH, Xu W, Anderson DL, Rossmann MG, Baker TS (1998) Assembly of a tailed bacterial virus and its genome release studied in three dimensions. *Cell* **95**: 431-437

Teschke CM, McGough A, Thuman-Commike PA (2003) Penton release from P22 heat-expanded capsids suggests importance of stabilizing penton-hexon interactions during capsid maturation. *Biophysical journal* **84**: 2585-2592

Topf M, Lasker K, Webb B, Wolfson H, Chiu W, Sali A (2008) Protein structure fitting and refinement guided by cryo-EM density. *Structure* **16**: 295-307

Trus BL, Booy FP, Newcomb WW, Brown JC, Homa FL, Thomsen DR, Steven AC (1996) The herpes simplex virus procapsid: structure, conformational changes upon maturation, and roles of the triplex proteins VP19c and VP23 in assembly. *Journal of molecular biology* **263**: 447-462

Valpuesta JM, Carrascosa JL (1994) Structure of viral connectors and their function in bacteriophage assembly and DNA packaging. *Q Rev Biophys* **27**: 107-155

van Heel M, Schatz M (2005) Fourier shell correlation threshold criteria. *Journal of structural biology* **151**: 250-262

Veesler D, Cambillau C (2011) A common evolutionary origin for tailed-bacteriophage functional modules and bacterial machineries. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 423-433, first page of table of contents

Veesler D, Johnson JE (2012) Virus maturation. *Annu Rev Biophys* **41**: 473-496

Weidel W (1958) Bacterial viruses; with particular reference to adsorption/penetration. *Annu Rev Microbiol* **12**: 27-48

White HE, Sherman MB, Brasiles S, Jacquet E, Seavers P, Tavares P, Orlova EV (2012) Capsid structure and its stability at the late stages of bacteriophage SPP1 assembly. *Journal of virology* **86**: 6768-6777

Wikoff WR, Liljas L, Duda RL, Tsuruta H, Hendrix RW, Johnson JE (2000) Topologically linked protein rings in the bacteriophage HK97 capsid. *Science* **289**: 2129-2133

Yamagishi M, Fujisawa H, Minagawa T (1985) Isolation and characterization of bacteriophage T3/T7 hybrids and their use in studies on molecular basis of DNA-packaging specificity. *Virology* **144**: 502-515

Yang F, Forrer P, Dauter Z, Conway JF, Cheng N, Cerritelli ME, Steven AC, Pluckthun A, Wlodawer A (2000) Novel fold and capsid-binding properties of the lambda-phage display platform protein gpD. *Nat Struct Biol* **7**: 230-237

Zandi R, Reguera D, Bruinsma RF, Gelbart WM, Rudnick J (2004) Origin of icosahedral symmetry in viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15556-15560



**8 Publicaciones**



# Molecular Rearrangements Involved in the Capsid Shell Maturation of Bacteriophage T7<sup>\*S</sup>♦

Received for publication, September 21, 2010 Published, JBC Papers in Press, October 20, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.187211

Alina Ionel<sup>‡</sup>, Javier A. Velázquez-Muriel<sup>§</sup>, Daniel Luque<sup>‡</sup>, Ana Cuervo<sup>‡</sup>, José R. Castón<sup>‡</sup>, José M. Valpuesta<sup>‡</sup>, Jaime Martín-Benito<sup>‡</sup>, and José L. Carrascosa<sup>‡1</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Macromolecular Structure, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain and the <sup>§</sup>Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences, Department of Pharmaceutical Chemistry, and California Institute for Quantitative Biosciences (QB3), University of California, San Francisco, California 94158

Maturation of dsDNA bacteriophages involves assembling the virus prohead from a limited set of structural components followed by rearrangements required for the stability that is necessary for infecting a host under challenging environmental conditions. Here, we determine the mature capsid structure of T7 at 1 nm resolution by cryo-electron microscopy and compare it with the prohead to reveal the molecular basis of T7 shell maturation. The mature capsid presents an expanded and thinner shell, with a drastic rearrangement of the major protein monomers that increases in their interacting surfaces, in turn resulting in a new bonding lattice. The rearrangements include tilting, in-plane rotation, and radial expansion of the subunits, as well as a relative bending of the A- and P-domains of each subunit. The unique features of this shell transformation, which does not employ the accessory proteins, inserted domains, or molecular interactions observed in other phages, suggest a simple capsid assembling strategy that may have appeared early in the evolution of these viruses.

Viruses adopt different evolutionary ways to survive due to their presence in many different hosts, including prokaryotes, eukaryotes, and archaea (1). This variability has obscured for years the observation of commonalities in the evolutionary origin, basic design, and life cycle strategies of these viruses. Besides the well studied principles in capsid architecture (2), it is becoming clear that there are basic components of viral structures, such as the capsid and connector proteins in the

case of bacteriophages, which share a surprising degree of similarity, as well as common general mechanisms of the maturation leading to the infective virion (3–5). These similarities are helpful to elucidate the evolutionary relationships previously obscured by the low sequence identity between equivalent proteins of different viruses, in turn informing virus classification (6–8).

Double-stranded DNA (dsDNA) bacteriophages (9) have been instrumental to study basic principles in assembly and maturation of viral particles (10, 11). dsDNA bacteriophages first assemble into an icosahedral prohead composed of a defined number of monomers of the main shell protein, scaffolding proteins, and a dodecameric connector. These three types of proteins must interact properly to yield a fully functional prohead with appropriate shape and size. Recent work suggests that the structure of these three basic components has been widely conserved across different bacteriophages. In particular, the fold of the shell protein was first described for the bacteriophage HK97 (12, 13) and later found in other viruses such as P22 (14), T4 (4),  $\phi$ 29 (15), HSV-1 (7),  $\epsilon$ 15 (16), T7 (17), and lambda (18). The HK97-like fold includes two domains: the P-domain, consisting of a long  $\alpha$ -helix and an elongated three-stranded  $\beta$ -sheet, and the A-domain, composed of two  $\alpha$ -helices and an additional  $\beta$ -sheet. Different bacteriophages incorporate additional domains in the main shell protein fold, resulting in different assembly mechanisms.

A major event in the maturation of dsDNA viruses is the packaging of the nucleic acid into the prohead. For this purpose, a complex machinery, consisting of the ATPases and pilot proteins, is assembled at the vertex of the prohead where the connector is located (3). Concomitant with the DNA packaging, the prohead undergoes a number of structural transformations (5, 11, 19) that can include expansion of the shell, *in situ* monomer rearrangements, release of the scaffolding proteins or incorporation of new components, such as accessory shell proteins or the virus tail, and chemical modifications such as cleavage or covalent cross-linking. The final outcome is a mature, infective virion.

Virus assembly and maturation offer a unique opportunity to dissect two correlated aspects: first, how a limited set of components is able to assemble in a complex structure; and second, the molecular basis of the process leading to the acquisition of stability necessary to search for the proper host. The existence of three transformation mechanisms to acquire

<sup>\*</sup> This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grants R01 GM083960, R01 GM54762, and PN2 EY016525 (to A. Sali). This work was also supported by Grants BFU2008-02328/BMC and Consolider CSD2007-00010 from the Dirección General de Investigación of the Ministry of Science and Innovation (to J. L. C.), S-2009/MAT-1507 from the Dirección General de Universidades e Investigación from the Madrid Government (to J. L. C.), BIO2008-02361 from the Dirección General de Investigación of the Ministry of Science and Innovation (to J. R. C.).

♦ This article was selected as a Paper of the Week.

The atomic coordinates and structure factors (codes 3IZG and 2XVR) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

The structure reported in this paper has been submitted to the Electron Microscopy Data Bank (EMDB) under accession number EMD-1810.

<sup>§</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org/>) contains supplemental Tables S1 and S2 and Figs. S1–S3.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-915854509; Fax: 34-34-91-5854506; E-mail: jlcarras@cnb.csic.es.



shell stability has been recently reviewed (20). The most common mechanism is the incorporation of accessory proteins that establish an additional set of contacts to reinforce those built by the main shell protein in the prohead. The contact sites for the accessory proteins are usually exposed after the rearrangement of the shell protein monomers during maturation, thus avoiding premature interactions leading to abortive assemblies. This mechanism applies to HSV-1 (21) and adenovirus (22), as well as to the bacteriophages, lambda (23), T4 (24), and  $\phi$ 15 (25). A second mechanism involves the generation of new interactions between neighboring subunits by using additional domains inserted within the primitive protein sequence. This strategy is employed by phages  $\phi$ 29 (15) and P22, in which the presence of an inserted domain with a telokin Ig-like fold has been related to a direct assembly of the capsid from monomeric subunits instead of intermediate capsomeric subassemblies (20). The third mechanism, which appears to be unique to HK97, involves the formation of covalent intersubunit cross-linking, leading to extensive interlocking of the shell in a giant superstructure (26).

The maturation process in bacteriophage T7 is of particular interest because the virus does not have accessory proteins, inserted domains, or cross-linking between subunits. T7 infects *Escherichia coli* and belongs to the Podoviridae family. It has a 40-kb dsDNA, an icosahedral capsid with a triangulation number of  $T = 7$ , and a non-contractile tail (27). The shell is made of 415 copies of protein gp10A. The prohead also contains a scaffolding protein (gp9) and a dodecameric connector (gp8) that attaches a core complex formed by proteins gp14, gp15, and gp16 to one of the 12 5-fold vertices (28). The virus tail is added to this vertex in the mature virion. The packaging machinery is also located at this vertex, forming a portal by incorporating terminases that select, cleave, and push the DNA inside the viral head through the connector. More specifically, the T7 prohead interacts with terminase gp19 to package the complex built by the DNA and terminase gp18 after cutting the unit length DNA from the replicating concatemers (29). The maturation of T7 involves the disappearance of the scaffolding protein, major rearrangements of the core, the incorporation of the tail, and a dramatic transformation of the shell, which undergoes a radial expansion. The structure of the T7 prohead has been solved by three-dimensional cryo-electron microscopy (cryo-EM)<sup>2</sup> at 2 nm resolution (27, 28), and a quasi-atomic model for the procapsid shell has also been obtained (17), revealing that the main protein gp10A has an HK97-like fold.

Here, we perform the cryo-EM reconstruction of the mature capsid together with a quasi-atomic model of its shell to elucidate the molecular details of T7 maturation. Comparing the shell of the prohead and the mature head reveals that T7 follows a maturation scheme that involves a change in the shell diameter from 51 to 60 nm and a decrease in its thickness from 4.5 to 2.3 nm due to a major rearrangement of the subunit domains. These transformations are based on the tilting, rotation, and radial translation of gp10 monomers,

resulting in a higher intermonomeric interacting surface. Our results suggest that T7 might represent one of the simplest primordial capsid maturation mechanisms.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Sample Preparation**—Mature T7 virions were purified from *E. coli* lysates of BL21 cells infected with wild type phage using sucrose gradient centrifugation as described elsewhere (28, 30). The composition of the purified viral particles was validated by SDS-PAGE analysis in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol. The viral DNA was released by incubation with 1 M NaClO<sub>4</sub> at 37 °C during 16 h. The empty heads were further purified by 10–40% sucrose gradient centrifugation. The homogeneity and overall quality of the samples was tested by electron microscopy of negatively stained aliquots. The samples were finally dialyzed against 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.1 M NaCl before cryo-electron microscopy.

**Electron Microscopy and Image Processing**—The samples were frozen in liquid ethane and transferred to an FEI TecnaiG<sup>2</sup> FEG200 cryo-electron microscope. Image acquisition and processing were performed as described previously (30). More specifically, the micrographs were recorded on Kodak SO-163 film under low dose conditions at a nominal magnification of 50,000 $\times$ , digitized in a Zeiss scanner (Photoscan TD, Z/I Imaging Corp.) using a 7- $\mu$ m step, and sampled to 0.14 nm/pixel. A total of 5100 particles were used to compute mean intensities and variances and to remove linear background gradients. The three-dimensional reconstruction was performed using the software packages Bsoft (31), Spider (32), and Xmipp (33, 34). Images were automatically sorted into defocus groups covering a range between  $-0.5$  and  $-3 \mu$ m.

Icosahedral symmetry was imposed throughout the refinement process. The final resolution for the reconstruction of the mature capsid was 1.08 nm using the 0.5 Fourier shell correlation criterion and 0.9 nm for 0.3 Fourier shell correlation (supplemental Fig. S1). Automated B-factor determination and compensation were performed with the EM-BFACTOR program, with a value for  $B_{\text{restore}}$  of  $-5.29 \text{ nm}^2$  (35).

**Segmentation and Structural Analysis**—Segmentation of the individual subunits from the reconstructed density was performed manually using the University of California San Francisco (UCSF) Chimera software (36). The segmentation was improved iteratively (17).

The electrostatic potential was calculated with the Coulombic Surface Coloring option in Chimera. Protein-protein interaction areas were determined using the PISA package (37). They were defined as one-half of the difference between the total accessible area in isolated monomers and that of the monomers assembled in the complex (38). Residues were considered interacting if any of the atoms were within 0.4 nm of each other, employing the CCP4i package (39). The interactions were cross-checked using Chimera with similar results.

**Generation of the gp10A Structure in the Head and Prohead from the Cryo-EM Maps**—To obtain the structure of the gp10A monomer in the mature capsid of T7, we started with a sequence alignment against the protein gp5 in the mature capsid of HK97 (Protein Data Bank (PDB) ID 1OHG). Seg-

<sup>2</sup> The abbreviation used is: cryo-EM, cryo-electron microscopy.

ment Leu<sup>100</sup>–Glu<sup>345</sup> in gp10A was aligned to segment Leu<sup>133</sup>–Pro<sup>373</sup> in gp5 with PSI-BLAST (40). Given the low sequence similarity between the two segments, we improved the alignment in Chimera by considering secondary structure computed with PSIPRED version 2.6 (41), using the alignment score weight of 20%. The resulting alignment conserved secondary structure and had the sequence identity of 14%. A comparative model was obtained with MODELLER (42) using standard parameters. The model was fit rigidly into the cryo-EM electron density by maximizing the cross-correlation using Chimera. Residues Leu<sup>126</sup>–Pro<sup>147</sup> in the E-loop of gp10A were removed because the corresponding density in the cryo-EM map could not be determined unambiguously. Next, flexible fitting was performed. The model  $\alpha$ -helices were first moved manually into the corresponding areas of the cryo-EM map using Chimera. The fit was refined by the Flex-EM program (43), keeping the helices and sheets as rigid bodies, and optimized with the conjugated gradients (CG) option. The resulting model was further improved in a second Flex-EM run, refining all atoms independently from each other using a molecular dynamics optimization. Only 2% of residues in the resulting model were outliers in the Ramachandran plot. Seven copies of this model were fit sequentially as rigid bodies into the cryo-EM density of the whole asymmetric unit. Subsequently, the previously deleted E-loop was added to each of the seven model copies followed by a simultaneous relaxation of the loop atoms in the cryo-EM map, using five steps of molecular dynamics with Flex-EM (see Fig. 2C). Finally, a complete model of the mature shell was then obtained by applying the icosahedral symmetry to the model of the asymmetric unit followed by a refinement of atomic positions with the URO program (44) that allowed us to retain the icosahedral symmetry during the refinement. The correlation coefficient between the complete model and the cryo-EM map is 0.70, whereas the local cross-correlation coefficient is 0.81.

The new structure for gp10A in the prohead was generated from gp5 in the prohead II of HK97 (PDB ID 3E8K). The same approach used for the mature head was employed, and the new model was basically identical to that published before (17), but it presented some minor reassignments of residues for the secondary structure elements. In this new structure, the E-loops were modeled, first manually adjusted, and refined later with molecular dynamics. Visual inspection of the fitting showed that E-loops are in the electron density previously assigned to them (17), although we consider their fitting less reliable than in the mature capsid.

**Graphical Data**—All graphical representations were rendered using the UCSF Chimera software.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Structure of the T7 Capsid Shell from Cryo-electron Microscopy**—An earlier study of T7 at 2 nm resolution using cryo-EM and three-dimensional reconstruction without imposing symmetry constraints revealed the overall changes undergone by the shell and the core-connector complex during the transformation of the prohead to the mature virus (28). An improvement in the resolution to 1 nm by imposing

icosahedral symmetry resulted in a quasi-atomic model of the prohead showing that the shell is formed by gp10A subunits arranged in an HK97-like conformation (17). In the current study, we have solved the structure of the mature capsid by a combination of single particle cryo-EM three-dimensional reconstruction using icosahedral symmetry and protein modeling. Then, we compared this structure with the T7 procapsid to learn about the molecular basis of this maturation process.

Preliminary reconstructions from purified mature T7 virions showed that the presence of DNA inside the capsid did not allow us to define the precise boundaries between the inner shell face and the outermost DNA layer. Thus, to obtain an accurate segmentation of the shell electron density and subsequently perform molecular modeling, we first eliminated the DNA from the virions by treating the preparation with a solution of NaClO<sub>4</sub> until total DNA ejection. After DNase treatment and further purification with sucrose gradient centrifugation, we obtained mature empty capsids composed of the main shell protein gp10A with only minor contents of gp10B and traces of the tail and core components (supplemental Fig. S2).

The electron density map (Fig. 1) of the empty capsid obtained by cryo-EM and three-dimensional reconstruction (see “Experimental Procedures”) had a resolution of  $\sim 1$  nm and was fully consistent with those obtained previously at lower resolution (Fig. 1A). The shell had an overall diameter of 60 nm with an average thickness of 2.5 nm, with the outer face being more corrugated than the inner face (Fig. 1B). The outer surface of the shell was smoother than in the prohead, and the gp10A protein formed almost symmetrical hexamers (Fig. 1C), with noticeable pentamers at the capsid vertices (Fig. 1D).

The asymmetric unit of the shell was segmented, and each of the seven copies of the protein gp10A was extracted manually. The segmentation was improved by an iterative alignment and averaging of the independent densities of the monomers. The resulting structures (Fig. 2A) showed that the mature subunit resembles that of the prohead shell, but important changes were also evident. The previously skewed hexamers of gp10A were more symmetric and more similar to the pentamers, which did not appear to have changed their 5-fold overall morphology. The structure of the monomer in the mature shell was similar for both the pentamer and the hexamer and was flatter than in the prohead, thus building a more extended capsomer.

**Modeling of the gp10A Monomer into the Mature Shell Capsid**—The observed similarity between the folds of the shell proteins gp10A in T7 and gp5 in HK97 was used to produce a quasi-atomic structure of the shell in the mature head of T7, as it was previously done for the prohead (17). We used the coordinates of gp5 in the mature shell of HK97, solved by x-ray crystallography (13, 45), to build a comparative model for gp10A that was flexibly fitted into the cryo-EM density of gp10A obtained by segmentation (see “Experimental Procedures”). Fig. 2B shows two views of the fitted model, with the A-domain (residues 210–300) in *red*, the P-domain (residues 100–119, 154–209, and 301–345) in *yellow*, and the E-loop



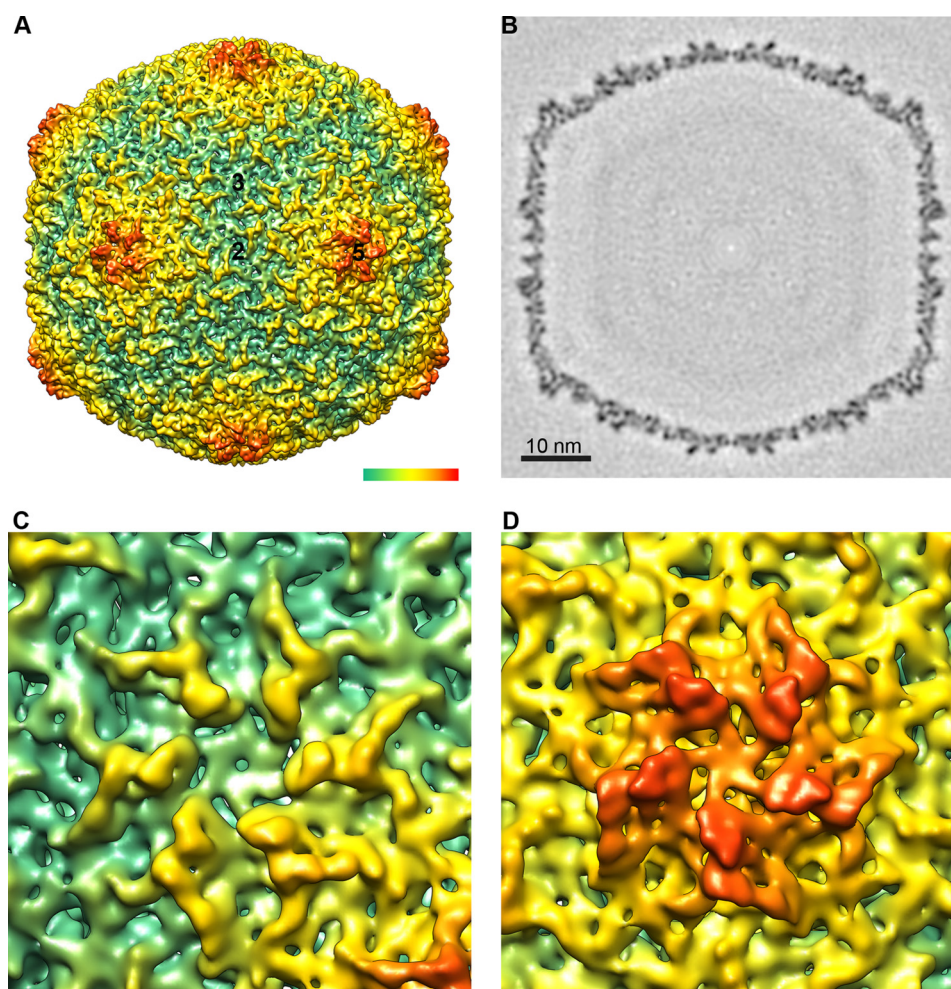


FIGURE 1. **Three-dimensional reconstruction of the mature capsid.** *A*, surface rendering viewed along a 2-fold axis of icosahedral symmetry. Numbers indicate the 5-fold, 3-fold, and 2-fold icosahedral symmetry axes. The color-coded bar represents depth measurement. *B*, central section through the density map. Bar represents 10 nm. *C*, close-up view of the hexamer. *D*, close-up view of the pentamer. The density is contoured at  $3\sigma$  above the mean.

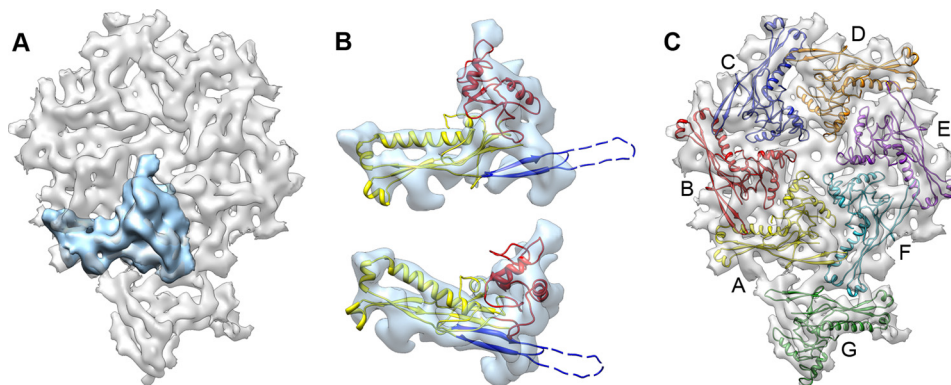
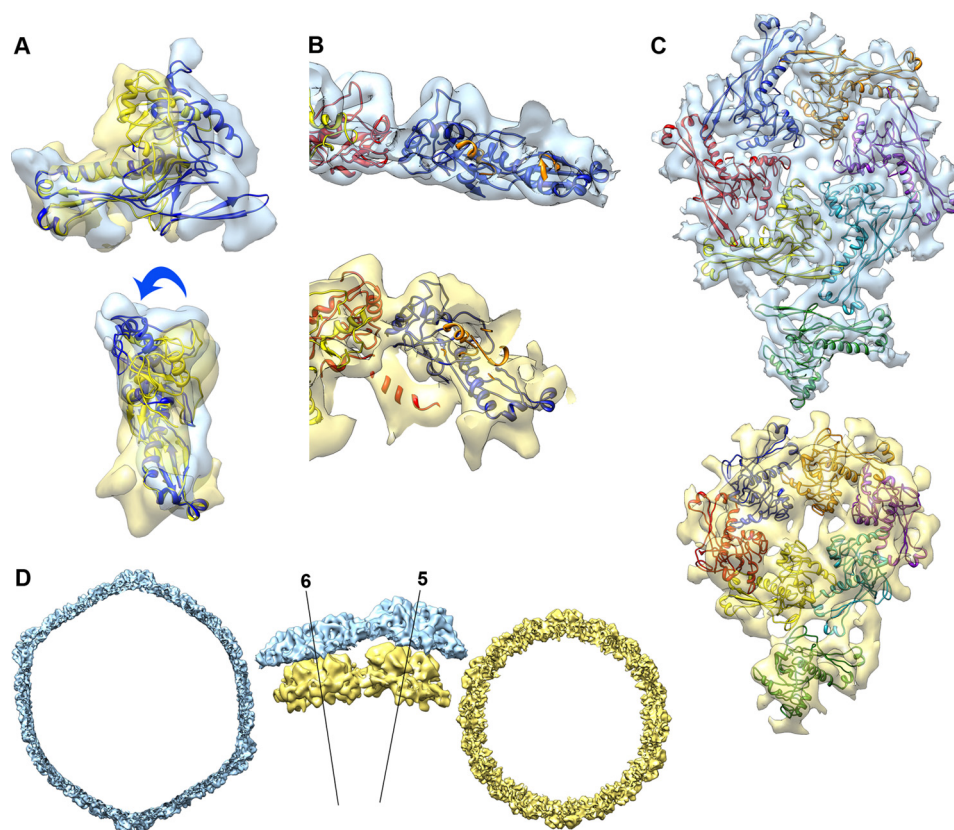


FIGURE 2. **Segmentation of the asymmetric unit and model of the shell protein gp10A.** *A*, one gp10A monomer subunit is shown in blue within the asymmetric unit in gray. *B*, gp10A model fitted in the averaged density of the hexameric monomers. Top, outer side view; bottom, perspective view. The ribbon model is colored for the different motifs: A-domain, red; P-domain, yellow; and E-loop, blue. Part of the E-loop (dashed line) is omitted as no hints for the corresponding densities are defined in the average density. *C*, a pseudo-atomic model of the asymmetric unit of the mature head. The unit contains an entire hexamer (subunits A–F) and one pentamer subunit (subunit G). The color code of the monomers in this figure is maintained throughout the entire report.

(residues 120–153) in blue. An initial asymmetric shell unit was built using this model, after which the structure of each of the seven monomers was individually refined against its corresponding experimental density (Fig. 2C). The structural alignment of the seven different monomers showed a good

overall fit, with the exception of the E-loop in the pentameric monomer, which showed a significant bend ( $\sim 30^\circ$ ) toward the interior of the capsid, as compared with the E-loop in the hexameric monomers. The model for the whole shell was obtained by applying icosahedral symmetry followed by global



**FIGURE 3. Structural changes involved in the T7 shell maturation.** *A*, superposition of models of gp10A for the prohead (yellow) and head (blue) obtained by alignment of the P-domain, showing the bending of the A-domain relative to the P-domain. *B*, detail of the head (top) and prohead (bottom) hexameric subunits shown tangential to the capsid surface. *C*, head (top) and prohead (bottom) asymmetric units shown from the outside of the capsid. *D*, cross-section view of the head (blue) and prohead (yellow) densities. The central detailed side views are shown tangential to the capsid surface, revealing the radial outward movement of the capsomers. The labeled lines represent radial axes along the center of the pentamer (5) and the hexamer (6).

refinement. The final molecular structure reproduced well the features of the cryo-EM map, with an overall correlation coefficient of 0.70 for the fitting and a local correlation coefficient of 0.81 for the area corresponding to the modeled coordinates. The resulting model showed that the shell of the mature capsid contains extensive contacts between subunits, with the A-domain mostly involved in the interactions between monomers within capsomers and the P-domain mostly involved in the interfaces between the pentamers and the hexamers.

**Structural Changes in the Shell after Maturation**—The most significant difference between the structure of gp10A in the mature head with respect to the prohead was the bending of the A-domain relative to the P-domain by 22° (Fig. 3*A*), which makes them more parallel to the shell surface. A similar relative movement between the A- and P-domains has previously been found in the maturation of HK97 (46) and P22 (20). Monomers were rearranged in the capsomers of the head relative to the prohead. The monomers located at different heights in the prohead hexamer were in the same plane in the mature shell. Their positions were adjusted differently depending on their previous location in the asymmetric unit, also including a change from a radial orientation to a planar shape (Fig. 3*B*). These changes generated a new set of contacts between monomers (Fig. 3*C*). The A-domain that protruded in the prohead shell became tangent to the surface

(Fig. 3*B*), which was in turn less corrugated. There were also changes in the orientation of the monomers in the plane of the shell, as follows. The monomers of the hexamer, which were distributed following a skewed, elliptical arrangement with a pseudo-2-fold symmetry axis, underwent an average of 30° in-plane rotation that increased the intercapsomeric distance from 11 to 13.4 nm and expanded the average hexamer diameter by around 25% (supplemental Fig. S3). The pentameric subunits moved similarly in a 16° in-plane rotation, which brought the diameter of the pentamer from 9.2 to 11.4 nm (24% expansion).

The thinning of the shell during maturation involves, besides the above mentioned bending of the A-domain relative to the P-domain, a change of the radial orientation of the monomers (Fig. 3*B*). The tilting angle was an average of 22° within the hexamers and 10° for the monomers within the pentamers. The smaller tilting angle made the mature pentamers protrude significantly from the shell and adopt a radial orientation more similar to that of the prohead (Fig. 3*D*). As a whole, the hexamers moved outward by 4.6 nm, and the pentamers moved outward by 5.4 nm. The overall consequence of all the described rearrangements was an increase in the diameter of the shell of T7 from 51 to 60 nm and a decrease in its thickness from 4.5 to 2.3 nm (Fig. 3*D*).

**Modification of the Fold in gp10A**—Apart from the bending of the A-domain with respect to the P-domain, we observed



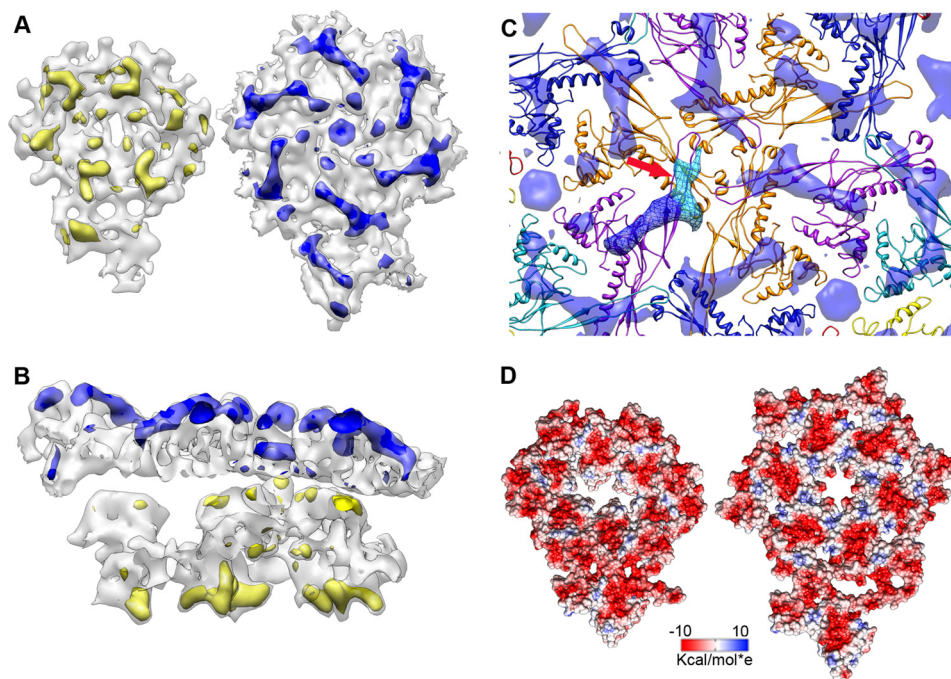


FIGURE 4. **Differences between prohead and mature head capsids.** *A*, left, difference map (yellow) between the experimental and modeled densities for the asymmetric unit of the prohead, as seen from the inner side of the shell. Right, difference map (blue) for the asymmetric unit of the mature head, as seen from the outside of the shell. The difference maps are rendered at  $5\sigma$ . *B*, side view of the difference maps. *C*, difference map around a 3-fold axis involving three identical copies of monomer D (Fig. 2). The volume attributed to the N-terminal domain is colored in dark blue, and the E-loop is in light blue (red arrow). *D*, electrostatic potential in the surface of the asymmetric unit, as seen from the inside of the virion. Left, prohead. Right, mature head. Negative charge is in red, and positive is in blue.

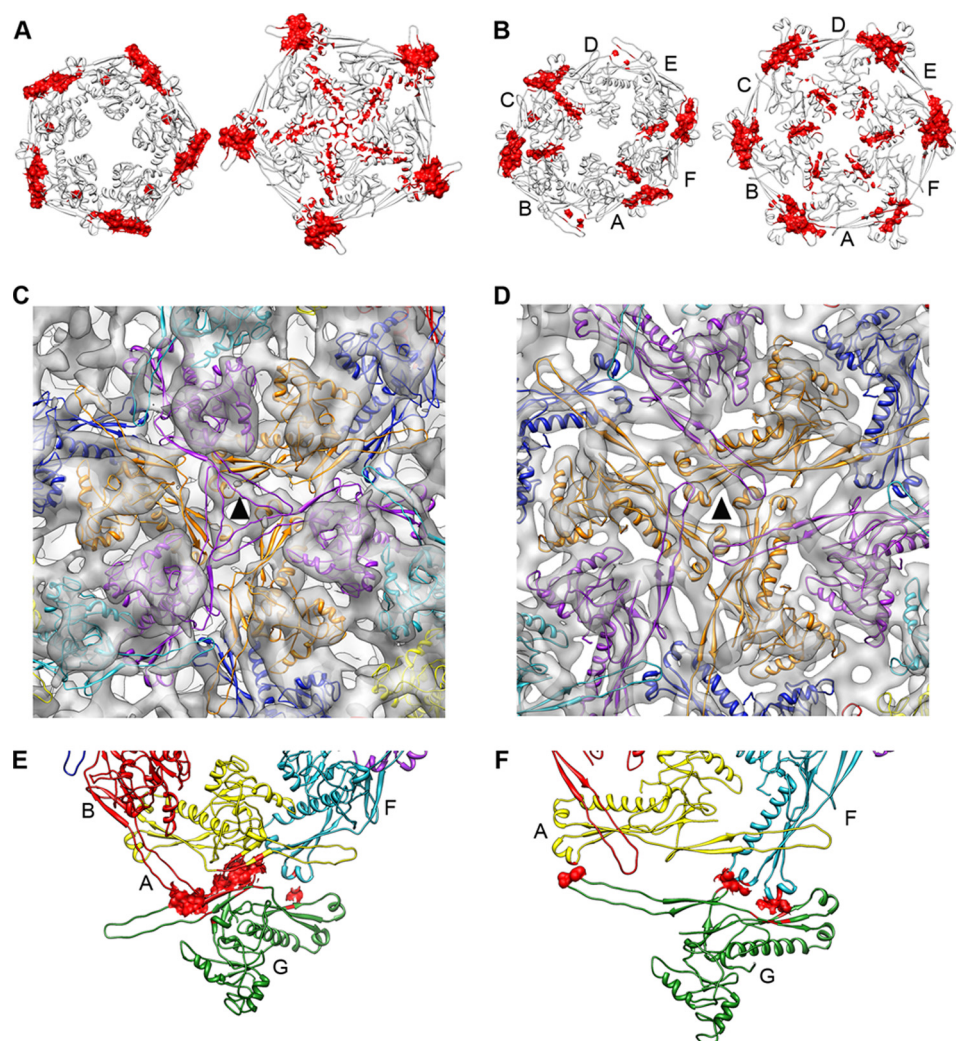
other differences in the fold of gp10A. Our model for the structure of gp10A lacked the N-terminal domain (residues 1–100) due to the low sequence identity of this stretch with its HK97 counterpart. This N-terminal domain was assigned in the prohead to a defined region at the inner part of the shell using difference maps between the cryo-EM map and the model (17). The same difference map for the mature shell located in this case the domain at the outer part (Fig. 4, *A* and *B*). In the mature head, the differential area has an L-shaped form (Fig. 4*C*), and it can be subdivided in two almost perpendicular domains; the largest one is in the neighborhood of the N terminus position of the modeled sequence stretch (Fig. 4*C*), and its average volume ( $11 \text{ nm}^3$  at  $3\sigma$ ) could accommodate 100 amino acids (assuming an average protein density of  $\sim 1.38 \text{ g} \times \text{cm}^3$ ). This rearrangement of the N-terminal domain from inside the shell toward the outer part has also been found in the maturation process of other viruses, such as poliovirus and T4 (47, 48). The N-terminal domain of gp10A was tentatively implicated in the interaction with the scaffolding protein in the T7 prohead (17). A similar domain interacting with the scaffold that also changes its inner position during maturation has been described in P22 (14). It is thus reasonable to propose that the N-terminal domain of gp10A in T7 is connected to the scaffolding lattice that stabilizes the prohead. Its outward movement, together with the rearrangement of shell subunits, would promote the release of the scaffolding proteins by preventing shell-scaffold interactions.

Another interesting feature was the change in the E-loop observed after its threading in the density. This part of the fold was described as involved in the interaction of neighbor-

ing capsomers but was not originally included into the modeling of gp10A (17). We identified the smaller portion of the L-shaped difference volume described above with this E-loop (Fig. 4*C*, arrow). In this work, we modeled the E-loop starting with a preliminary fitting that did not include it until we got a final complete structure. Its new location in the hexamers suggests that it might be responsible for reinforcing the interactions of monomers around the 3-fold and quasi-3-fold symmetry axes. At this resolution, it was not possible to determine whether the modification of the fold of gp10A involves any twisting and/or bending of the  $\alpha$ -helices or  $\beta$ -sheets, as recently described for HK97 (46).

Another consequence of the structural rearrangements involved in the T7 shell maturation is the change of the electrostatic potential at the inner face of the shell. Although the prohead shell inner face was almost totally negatively charged, this inner face in the mature head showed the presence of positively charged domains (Fig. 4*D*). This implies that new contacts between the inner face of the shell and the outermost layer of the packaged DNA could be established, either during the packaging process or in the final DNA packaged viral particle.

**Changes in the Interactions between Monomers**—The interactions between the capsid monomers changed during the shell maturation for both intracapsomeric and intercapsomeric contacts. On the intracapsomeric side, the main contacts within the prohead pentameric monomers were established using the P-domains with mostly hydrophobic contacts (supplemental Table S1). The mature pentamers exhibited additional, mostly polar and charged contact areas also involving



**FIGURE 5. Changes in the interactions during the maturation of the T7 shell.** In all cases, the figures on the *left* are for the prohead, and the mature head is on the *right*. *A*, contact surfaces for the pentamer (red). The view is from the outside of the capsid. *B*, contact surfaces for the hexamer (red). *C* and *D*, interactions around the 3-fold axis (triangle) in the prohead (*C*) and mature head (*D*). *E* and *F*, residues involved in pentameric-hexameric interactions (red) in the prohead (*E*) and mature head (*F*).

the A-domain (Fig. 5A). There was an overall increase of the contact area between adjacent monomers from 7.7 nm<sup>2</sup>/contact in the prohead pentamer up to 11.5 nm<sup>2</sup> in the mature form (supplemental Table S2). In the case of the hexamer, the area of all the contacts between monomers also increased and reflected the 2-fold symmetry of the capsomer (Fig. 5B and supplemental Table S2). In the mature shell, the interactions were closer to 6-fold symmetrical, as expected. This increase of the monomer contact areas during the T7 maturation was consistent with the results obtained for HK97 (49).

The intercapsomeric contacts in hexamers were mainly centered on the 3-fold and quasi-3-fold symmetry axes and were based on polar and charged residues. In the prohead, they involved the P-loop from one subunit (residues 172–165 and 321–328), the P-domain from the nearest neighbor, and an additional interaction of these two domains with the E-loop from an adjacent subunit (Fig. 5C). The basic bonding pattern was maintained after the maturation (Fig. 5D), although the interface area between monomers increased from 0.4 to 3.2 nm<sup>2</sup>. The intercapsomeric interactions between

hexamers and pentamers were also modified (Figs. 5, E and F). In the prohead, there were three different types of contacts between monomers: A/G, F/G, and B/G, all using P-domain/P-domain interactions. In the mature head, the contacts were between monomers F/G (P-loop/P-domain) and monomers A/G (P-loop/E-loop).

**Capsid Stabilization**—The stabilization of the capsid in dsDNA virus follows different strategies. Certain phages incorporate accessory proteins to the shell to reinforce the contacts between capsomers and to stabilize the mature virion. T4, lambda, and  $\phi$ 15 are examples of phages that use this strategy.  $\phi$ 29 and P22 have additional domains inserted into the HK97-like fold to form new contacts over the basic network provided by the basal fold. In HK97, the reinforcement of the shell is attained by covalent cross-linking of neighboring subunits that secures the assembly. Underlying these differences, there is a common trend, which involves the expansion of the capsid based on a rearrangement of the capsid subunits. We have found that T7 follows a strategy to stabilize the shell that might represent a simpler, more primitive



mechanism for capsid maturation. The maturation is based on a drastic rearrangement of the subunits from the prohead to the mature head that leads to a reinforcement of the bonding pattern, without intervention of any additional help. This rearrangement includes a complex set of changes at all structural levels, as follows. The fold of gp10A changes with a bending of the A-domain in respect to the P-domain, the N-terminal part of gp10A moves outwards, and the E-loop bends and further covers the monomers; the monomers perform translations, in-plane rotations, and tilting with angles that depend on their positions into the hexameric or pentameric capsomers; and the pentamers and hexamers increase their radii and symmetry. The result is an expanded, thinner shell in which the interacting areas between subunits are larger to reinforce the bonding lattice.

Despite these changes, there are some features in the monomer basic bonding pattern that are conserved. The contact topology around the 3-fold and quasi-3-fold symmetry axes is maintained; the P-domain/P-loop interactions between neighboring subunits are mostly the same after maturation (Fig. 5, C and D); and the E-loop swapping from adjacent subunits, although expanded, is still present. HK97 has the same conservation of the E-loop interactions, and these contacts at the 3-fold axis have been suggested as fixed points acting as hinges to secure the subunit rearrangements (46). It is probable that they play the same role in T7 as well.

In summary, our results indicate that the maturation of T7 is more similar to the maturation mechanism of HK97 than to the maturation in P22-like systems (20). Nevertheless, as no chemical cross-linking is involved in T7 maturation, it could be speculated that T7 represents the most basic system of capsid maturation. HK97 would represent a more advanced strategy that still does not employ additional folds or proteins. Other phages would have incorporated their accessory proteins later in evolution to facilitate their maturation process and/or to incorporate further functionalities.

**Acknowledgments**—The support, critical comments, and revisions of Andrej Sali are greatly acknowledged. We are indebted to Xabier Agirrezabala for previous work in our laboratory on the T7 virus structure and in particular for the preliminary study of mature capsids containing DNA. We also thank Nuria Verdaguer for constructive comments. We are grateful to Ron Conway, Mike Homer, Intel, Hewlett-Packard, IBM, and Netapp for computer hardware gifts to A. Sali.

## REFERENCES

- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L. A. (eds) (2005) *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego.
- Casjens, S., Chiu, W., Burnett, R. M., and Garcea, R. L. (1997) in *Structural Biology of Viruses*, pp. 38–79, Oxford University Press, New York.
- Valpuesta, J. M., and Carrascosa, J. L. (1994) *Q. Rev. Biophys.* **27**, 107–155.
- Fokine, A., Leiman, P. G., Shneider, M. M., Ahvazi, B., Boeshans, K. M., Steven, A. C., Black, L. W., Mesyanzhinov, V. V., and Rossmann, M. G. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 7163–7168.
- Steven, A. C., Heymann, J. B., Cheng, N., Trus, B. L., and Conway, J. F. (2005) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 227–236.
- Bamford, D. H., Grimes, J. M., and Stuart, D. I. (2005) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 655–663.
- Baker, M. L., Jiang, W., Rixon, F. J., and Chiu, W. (2005) *J. Virol.* **79**, 14967–14970.
- Benson, S. D., Bamford, J. K., Bamford, D. H., and Burnett, R. M. (2004) *Mol. Cell* **16**, 673–685.
- Ackermann, H. W. (1998) *Adv. Virus Res.* **51**, 135–201.
- Ackermann, H. W. (2003) *Res. Microbiol.* **154**, 245–251.
- King, J., and Chiu, W. (1997) in *Structural Biology of Viruses* (Chiu, W., Burnett, R. M., and Garcea, R. L., eds) pp. 288–311, Oxford University Press, New York.
- Hendrix, R. W. (2005) *Adv. Virus Res.* **64**, 1–14.
- Wikoff, W. R., Liljas, L., Duda, R. L., Tsuruta, H., Hendrix, R. W., and Johnson, J. E. (2000) *Science* **289**, 2129–2133.
- Jiang, W., Li, Z., Zhang, Z., Baker, M. L., Prevelige, P. E., Jr., and Chiu, W. (2003) *Nat. Struct. Biol.* **10**, 131–135.
- Morais, M. C., Choi, K. H., Koti, J. S., Chipman, P. R., Anderson, D. L., and Rossmann, M. G. (2005) *Mol. Cell* **18**, 149–159.
- Jiang, W., Chang, J., Jakana, J., Weigele, P., King, J., and Chiu, W. (2006) *Nature* **439**, 612–616.
- Agirrezabala, X., Velázquez-Muriel, J. A., Gómez-Puertas, P., Scheres, S. H., Carazo, J. M., and Carrascosa, J. L. (2007) *Structure* **15**, 461–472.
- Lander, G. C., Evilevitch, A., Jeembaeva, M., Potter, C. S., Carragher, B., and Johnson, J. E. (2008) *Structure* **16**, 1399–1406.
- Johnson, J. E. (2010) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 210–216.
- Parent, K. N., Khayat, R., Tu, L. H., Suhanovsky, M. M., Cortines, J. R., Teschke, C. M., Johnson, J. E., and Baker, T. S. (2010) *Structure* **18**, 390–401.
- Trus, B. L., Booy, F. P., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Homa, F. L., Thomsen, D. R., and Steven, A. C. (1996) *J. Mol. Biol.* **263**, 447–462.
- Saban, S. D., Silvestry, M., Nemerow, G. R., and Stewart, P. L. (2006) *J. Virol.* **80**, 12049–12059.
- Yang, F., Forrer, P., Dauter, Z., Conway, J. F., Cheng, N., Cerritelli, M. E., Steven, A. C., Plückthun, A., and Wlodawer, A. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 230–237.
- Fokine, A., Chipman, P. R., Leiman, P. G., Mesyanzhinov, V. V., Rao, V. B., and Rossmann, M. G. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 6003–6008.
- Jiang, W., Baker, M. L., Jakana, J., Weigele, P. R., King, J., and Chiu, W. (2008) *Nature* **451**, 1130–1134.
- Conway, J. F., Duda, R. L., Cheng, N., Hendrix, R. W., and Steven, A. C. (1995) *J. Mol. Biol.* **253**, 86–99.
- Cerritelli, M. E., Conway, J. F., Cheng, N., Trus, B. L., Steven, A. C., Chiu, W., and Johnson, J. E. (2003) in *Advances in Protein Chemistry* (Richards, F. M., Eisenberg, D. S., and Kuriyan, J., eds) pp. 301–323, Academic Press, Orlando, FL.
- Agirrezabala, X., Martín-Benito, J., Castón, J. R., Miranda, R., Valpuesta, J. M., and Carrascosa, J. L. (2005) *EMBO J.* **24**, 3820–3829.
- Fujisawa, H., and Morita, M. (1997) *Genes Cells* **2**, 537–545.
- Agirrezabala, X., Martín-Benito, J., Valle, M., González, J. M., Valencia, A., Valpuesta, J. M., and Carrascosa, J. L. (2005) *J. Mol. Biol.* **347**, 895–902.
- Heymann, J. B., and Belnap, D. M. (2007) *J. Struct. Biol.* **157**, 3–18.
- Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M., and Leith, A. (1996) *J. Struct. Biol.* **116**, 190–199.
- Scheres, S. H., Núñez-Ramírez, R., Sorzano, C. O., Carazo, J. M., and Marabini, R. (2008) *Nat. Protoc.* **3**, 977–990.
- Sorzano, C. O., Marabini, R., Velázquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J. R., Scheres, S. H., Carazo, J. M., and Pascual-Montano, A. (2004) *J. Struct. Biol.* **148**, 194–204.
- Fernández, J. J., Luque, D., Castón, J. R., and Carrascosa, J. L. (2008) *J. Struct. Biol.* **164**, 170–175.
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612.
- Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797.
- Gretes, M., Lim, D. C., de Castro, L., Jensen, S. E., Kang, S. G., Lee, K. J.,



## Capsid Shell Maturation of Bacteriophage T7

- and Strynadka, N. C. (2009) *J. Mol. Biol.* **389**, 289–305
39. Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M., and Dodson, E. (2003) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59**, 1131–1137
40. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402
41. McGuffin, L. J., Bryson, K., and Jones, D. T. (2000) *Bioinformatics* **16**, 404–405
42. Sali, A., and Blundell, T. L. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815
43. Topf, M., Lasker, K., Webb, B., Wolfson, H., Chiu, W., and Sali, A. (2008) *Structure* **16**, 295–307
44. Navaza, J., Lepault, J., Rey, F. A., Alvarez-Rúa, C., and Borge, J. (2002) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1820–1825
45. Helgstrand, C., Wikoff, W. R., Duda, R. L., Hendrix, R. W., Johnson, J. E., and Liljas, L. (2003) *J. Mol. Biol.* **334**, 885–899
46. Gertsman, I., Gan, L., Guttman, M., Lee, K., Speir, J. A., Duda, R. L., Hendrix, R. W., Komives, E. A., and Johnson, J. E. (2009) *Nature* **458**, 646–650
47. Belnap, D. M., Filman, D. J., Trus, B. L., Cheng, N., Booy, F. P., Conway, J. F., Curry, S., Hiremath, C. N., Tsang, S. K., Steven, A. C., and Hogle, J. M. (2000) *J. Virol.* **74**, 1342–1354
48. Steven, A. C., Bauer, A. C., Bisher, M. E., Robey, F. A., and Black, L. W. (1991) *J. Struct. Biol.* **106**, 221–236
49. Conway, J. F., Wikoff, W. R., Cheng, N., Duda, R. L., Hendrix, R. W., Johnson, J. E., and Steven, A. C. (2001) *Science* **292**, 744–748